

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
-  BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

8/5/6

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009565130

WPI Acc No: 1993-258678/199332

XRAM Acc No: C93-114921

New von Willebrand factor antagonist fusion proteins - comprising antagonist fragment linked to stabilising protein, useful as antithrombotic agents

Patent Assignee: RHONE POULENC RORER SA (RHON)

Inventor: FLEER R; FOURNIER A; GUITTON J; JUNG G; YEH P

Number of Countries: 022 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 9315200	A1	19930805	WO 93FR87	A	19930128	199332	B
FR 2686901	A1	19930806	FR 921066	A	19920131	199344	
FI 9403565	A	19940729	WO 93FR87	A	19930128	199437	
			FI 943565	A	19940729		
NO 9402840	A	19940929	WO 93FR87	A	19930128	199444	
			NO 942840	A	19940729		
EP 625199	A1	19941123	EP 93904131	A	19930128	199445	
			WO 93FR87	A	19930128		
JP 7503369	W	19950413	JP 93512988	A	19930128	199523	
			WO 93FR87	A	19930128		

Priority Applications. (No Type Date): FR 921066 A 19920131

Cited Patents: 2.Jnl.Ref; EP 255206; EP 41362; WO 9113093; WO 9206999; WO 9217192; WO 9300357

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9315200 A1 F 48 C12N-015/12

Designated States (National): CA FI JP NO US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

FR 2686901 A1 36 C12P-021/02

EP 625199 A1 F C12N-015/12 Based on patent WO 9315200

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

JP 7503369 W C12N-015/09 Based on patent WO 9315200

FI 9403565 A C12N-000/00

NO 9402840 A C12N-015/62

Abstract (Basic): WO 9315200 A

New recombinant polypeptides comprise: (a) an adhesive portion derived from the structure of von Willebrand's factor (vWF) and capable of at least partially antagonising the binding of vWF to platelets and/or subendothelium, and (b) a portion permitting the stabilisation and presentation of (a) in vivo.

Also claimed are: (1) a nucleotide sequence coding for (I); (2) an expression cassette comprising sequence (1) under the control of a transcription initiation region and opt. a transcription termination region; (3) a self-replicating plasmid contg. cassette (2); and (4) a recombinant eukaryotic or prokaryotic cell contg. sequence (1), cassette (2) or plasmid (3).

USE/ADVANTAGE -- (I) are platelet aggregation inhibitors, some with higher activity than RG12986 (Bio Tech., 10, 66, 1992) and some being

effective in the absence of botrocetin-type cofactors. They are esp.
useful for treatment or prophylaxis of thrombosis.

Dwg.0/9

Title Terms: NEW; FACTOR; ANTAGONIST; FUSE; PROTEIN; COMPRISE; ANTAGONIST;
FRAGMENT; LINK; STABILISED; PROTEIN; USEFUL; ANTITHROMBOTIC; AGENT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09; C12N-015/12; C12N-015/62;
C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/43;
C07K-013/00; C07K-019/00; C12N-001/19; C12N-005/10; C12N-015/14;
C12N-015/81

File Segment: CPI

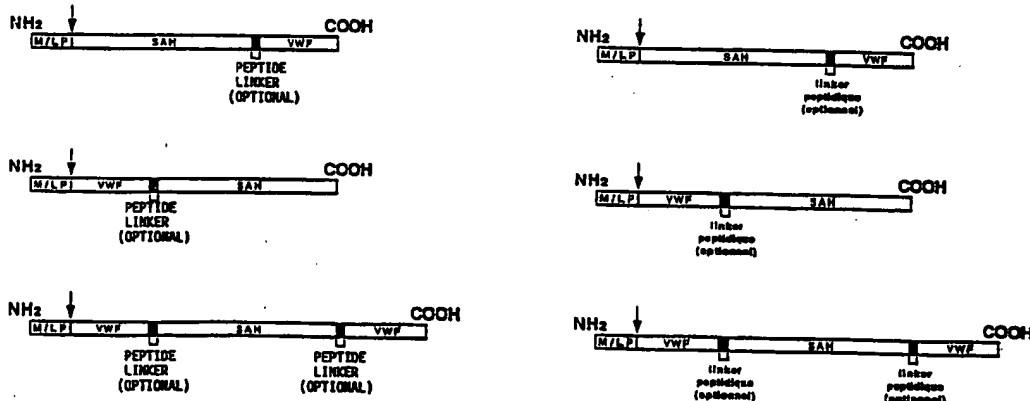


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/12, 15/62, 15/14 C12N 5/10, A61K 37/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15200 (43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00087		(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).
(22) Date de dépôt international: 28 janvier 1993 (28.01.93)		
(30) Données relatives à la priorité: 92/01066 31 janvier 1992 (31.01.92) FR		(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(72) Inventeurs; et		
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): FLEER, Reinhard [DE/FR]; 47, avenue Beauséjour, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). FOURNIER, Alain [FR/FR]; 28, avenue Roger-Salengro, F-92000 Châtenay-Malabry (FR). GUILTON, Jean-Dominique [FR/FR]; 74, rue Dunois, F-75013 Paris (FR). JUNG, Gérard [FR/FR]; 12, rue des Grands-Jardins, Leuville-sur-Orge, F-91310 Montlhéry (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).		

(54) Titre: ANTITHROMBOTIC POLYPEPTIDES AS ANTAGONISTS OF THE BINDING OF VWF TO PLATELETS OR TO SUBENDOTHELIUM

(54) Titre: POLYPEPTIDES ANTITHROMBOTIQUES, ANTAGONISTES DE LA LIAISON DU VWF AUX PLAQUETTES ET/OU AU SOUS-ENDOTHELIUM



(57) Abstract

Recombinant polypeptides consisting of an adhesive portion derived from the structure of the vWF which is at least partially antagonistic to the bond between said vWF and the platelets and/or the subendothelium, as well as a portion for stabilising and presenting it *in vivo*; preparation thereof; and pharmaceutical compositions containing said polypeptides.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des polypeptides recombinants composés d'un partie adhésive dérivée de la structure du vWF capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, et d'une partie permettant sa stabilisation et sa présentation *in vivo*, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	CA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	CB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	CN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	CR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique du Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

POLYPEPTIDES ANTITHROMBOTIQUES, ANTAGONISTES DE LA LIAISON DU VWF AUX PLAQUETTES ET/OU AU SOUS-ENDOTHELIUM.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides 5 antithrombotiques, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides comportant une partie dérivée de la structure du facteur de von Willebrand (vWF) et intrinsèquement capable de se fixer aux plaquettes sanguines et/ou au sous-endothélium.

Le vWF est une protéine glycosylée de 2813 acides aminés comprenant une 10 séquence signal de 22 résidus, un région "pro" de 741 résidus et une protéine mature de 2050 acides aminés organisée en plusieurs structures répétées [Titani K. et al., Biochemistry 25 (1986) 3171-3184; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847]. Cette glycoprotéine complexe est présente in vivo, soit stockée dans des 15 vésicules spécialisées des cellules endothéliales ou des plaquettes, soit sous forme circulante dans le plasma sanguin après sécrétion et maturation protéolytique lors du processus de sécrétion. Les formes circulantes du vWF sont présentes sous la forme de multimères de haut poids moléculaire (jusqu'à 20 000 kDa) et dont le protomère est un dimère d'environ 450 kDa. Le gène du vWF a été cloné et séquencé par 20 plusieurs équipes et mappé sur le bras court du chromosome 12 [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171; Bonthron D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127; Ginsburg D. et al., Science 228 (1985) 1401-1406].

Le vWF est impliqué dans la génèse des thrombus artériels par une 25 interaction complexe et mal comprise entre certains composants du sous-endothélium d'une part et les plaquettes sanguines d'autre part (et notamment les récepteurs GP1b plaquettaires). Un point important est que le vWF plasmatique circulant ne lie pas spontanément les récepteurs GP1b des plaquettes, et il est 30 vraisemblable que son interaction avec le sous-endothélium soit nécessaire pour démasquer son (ses) site(s) d'interaction avec les plaquettes, par exemple à la suite d'un changement conformationnel du vWF. L'interaction entre le vWF ainsi activé et

les GP1b plaquettaires conduit à l'activation des plaquettes sanguines qui acquièrent alors la capacité de s'aggréger et de générer un thrombus fibrino-cellulaire en présence de certaines protéines adhésives (fibrinogène, thrombospondine, vWF etc.).

5 Compte tenu de son rôle précoce dans l'activation plaquettaire, le vWF constitue une cible pharmacologique de choix pour la réalisation d'agents antithrombotiques. Toutefois, de nombreuses difficultés doivent être surmontées pour pouvoir exploiter cette molécule sur le plan pharmacologique : l'incapacité du vWF circulant à lier les plaquettes, la méconnaissance de la contribution respective
10 des différentes fonctions adhésives du vWF (sous-endothélium et plaquettes) dans son activité thrombogénique, la difficulté de produire à des niveaux suffisamment élevés des produits suffisamment purs et homogènes pour pouvoir être utilisés comme agents thérapeutiques, la taille importante du vWF et sa complexité, la dynamique de sa structure tertiaire, etc... Certains fragments du vWF ont été obtenus
15 par digestion protéolytique et étudiés sur le plan pharmacologique. Des fragments recombinants ont également été produits [EP 255 206 ; Sugimoto M. et al., Biochemistry 30 (1991) 5202-5209 ; Azuma H. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 12342-12347]. Il ressort de ces études que les molécules obtenues ne sont pas totalement satisfaisantes, et en particulier, ne se comportent pas comme des
20 antagonistes optimaux de l'interaction vWF-plaquettes en l'absence de certains ligands non physiologiques (tels que la ristocétine ou la botrocétine par exemple), ou encore doivent être modifiés chimiquement (réduction et alkylation par exemple), probablement pour démasquer les sites cryptiques de liaison du vWF à la GP1b plaquettaire.

25 La présente invention fournit de nouvelles molécules intrinsèquement capables d'antagoniser au moins partiellement l'activation plaquettaire. Les molécules de l'invention comportent une partie adhésive dérivée de la structure du vWF et une partie permettant sa présentation fonctionnelle et assurant la stabilité et la distribution in vivo de la molécule. La demanderesse a en effet montré qu'il est
30 possible de coupler génétiquement le vWF à une structure de nature protéique, et de produire de telles molécules à des niveaux satisfaisants. Les molécules de l'invention permettent de plus de générer et d'utiliser de petites structures dérivées du vWF et donc très spécifiques d'un effet recherché (par exemple antagonistes de la seule

interaction vWF-GP1b). La demanderesse a par ailleurs montré qu'un tel couplage favorisait la présentation de cette structure à son/ses sites de liaison. Les polypeptides de l'invention permettent donc d'exposer, au sein d'une structure stable, des structures dérivées du vWF capables d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes, et de ce fait d'inhiber l'activation plaquettaire. Les polypeptides de l'invention permettent également d'exposer, au sein d'une structure stable, des structures dérivées du vWF capables d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au sous-endothélium.

Un objet de la présente invention concerne donc des molécules comportant une partie adhésive dérivée de la structure du vWF capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, et une partie de nature protéique permettant sa stabilisation et sa présentation in vivo.

Plus particulièrement, dans les molécules de l'invention, la partie adhésive est constituée par tout ou partie de la séquence peptidique comprise entre les résidus 445-733 du vWF ou d'un variant de celle-ci. La séquence peptidique du vWF ayant été publiée, la numérotation des résidus de la partie adhésive des molécules de l'invention se réfère à la numérotation de la séquence du vWF publiée par Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Il est entendu que cette fonction peut être redondante au sein des molécules de la présente invention. Une partie de cette séquence du vWF (résidus Thr470 à Val713) est indiquée à la Figure 1, dans laquelle elle est couplée en C-terminal de la sérum-albumine humaine.

Au sens de la présente invention, le terme variant désigne toute molécule obtenue par modification de la séquence capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification obtenue, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique. De tels variants peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité de la molécule pour son (ses) site(s) de fixation, celui d'améliorer ses niveaux de production, celui de réduire sa susceptibilité à des protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou encore de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés.

pharmacocinétiques ou biologiques telles que notamment des fonctions adhésives exprimée de façon intrinsèquement non cryptique.

Des polypeptides de l'invention particulièrement avantageux sont ceux dans lesquels la partie adhésive présente:

- 5 (a) la séquence peptidique comprise entre les résidus 445-733 du vWF, ou,
 (b) une partie de la séquence peptidique (a) capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
10 (c) une structure dérivée des structures (a) ou (b) par modifications structurales (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
 (d) une séquence peptidique non naturelle, par exemple isolée à partir de banques peptidiques et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium.

15 Parmi les structures du type (b), on peut citer plus particulièrement celles ayant conservé la capacité d'antagoniser l'interaction entre le vWF et la GP1b plaquettaire, telles que par exemple les peptides G10 ou D5 décrits par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904], ou les peptides ayant conservé la capacité de lier le collagène [Pareti F.I. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 15310-15315 ; Roth 20 G.J. et al. Biochemistry 25 (1986) 8357-8361], et/ou l'héparine [Fujimura Y. et al. J. Biol. Chem. 262 (1987) 1734-1739] et/ou la botrocétine [Sugimoto M. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 18172-18178], et/ou les sulfatides [Christophe O. et al. Blood 78 (1991) 2310-2317] et/ou la ristocétine etc., ou toute combinaison entre ces différentes fonctions adhésives.

25 Les structures du type (c) comprennent par exemple les molécules dans lesquelles certains sites de N- ou O-glycosylation ont été modifiés ou supprimés, ainsi que les molécules dans lesquelles un, plusieurs, voire tous les résidus cystéine ont été substitués, ou encore des mutants ponctuels et/ou multiples concernant au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type II B associées au vWF comme 30 les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val553 ou Arg578 par exemple. Elles comprennent également des molécules obtenues à partir de (a) ou (b) par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés, et des molécules comportant par rapport à (a) ou (b) des résidus supplémentaires, tels que par exemple une méthionine N-terminale et/ou une

séquence signal de sécrétion et/ou un adaptateur polypeptidique permettant la jonction à la structure stabilisatrice.

A titre d'exemple on peut citer des polypeptides de l'invention comportant la structure stabilisatrice couplée:

- 5 - à un peptide de type P1 dont la version minimale correspond au peptide G10 compris entre les résidus Cys474 et Pro488 du vWF, ou,
- à un peptide de type P2 dont la version minimale correspond au peptide D5 compris entre les résidus Leu694 et Pro708 du vWF ou,
- à un peptide de type X ou XD qui correspondent respectivement au fragment du vWF compris entre les résidus Pro488 et Leu694, et ses variants obtenus par délétion, ou,
- 10 - à un peptide de type X* défini comme tout variant moléculaire des peptides de type X et XD , ou,
- à toute combinaison de ces peptides, et entre autres :
- 15 - les peptides de type P1-P2 ;
- les peptides de type P1-X, P1-XD, P1-X* ;
- les peptides de type X-P2, XD-P2, X*-P2 ;
- les peptides de type P1-X-P2 ;
- les peptides de type P1-XD-P2 ;
- 20 - les peptides de type P1-X*-P2 ;
- tout peptide adhésif tel que défini plus avant et représenté plus d'une fois au sein de la molécule de l'invention.

La partie adhésive des molécules de l'invention peut être couplée, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un peptide de jonction à la structure stabilisatrice protéique. De plus, elle peut constituer l'extrémité N-terminale comme l'extrémité C-terminale de la molécule. Préférentiellement, dans les molécules de l'invention, la partie adhésive constitue la partie C-terminale de la chimère.

Préférentiellement, la structure stabilisatrice des polypeptides de l'invention est un polypeptide possédant une demi-vie plasmatique élevée. A titre d'exemple, il 30 peut s'agir d'une protéine telle qu'une albumine, une apolipoprotéine, une immunoglobuline ou encore une transférine, etc... Il peut également s'agir de peptides dérivés de telles protéines par modifications structurales, ou de peptides

synthétisés artificiellement ou semi-artificiellement, et possédant une demi-vie plasmatique élevée. Par ailleurs, la structure stabilisatrice utilisée est plus préférentiellement un polypeptide faiblement ou non-immunogénique pour l'organisme dans lequel le polypeptide de l'invention est utilisé.

5 Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, la structure stabilisatrice est une albumine ou un variant de l'albumine et par exemple la sérum-albumine humaine (SAH). Il est entendu que les variants de l'albumine désignent toute protéine à haute demi-vie plasmatique obtenue par modification (mutation, délétion et/ou addition) par les techniques du génie génétique d'un gène codant pour un isomorphe donné de la sérum-albumine humaine, ainsi que toute 10 macromolécule à haute demi-vie plasmatique obtenue par modification in vitro de la protéine codée par de tels gènes. L'albumine étant très polymorphe, de nombreux variants naturels ont été identifiés et répertoriés [Weitkamp L.R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219]. A titre d'exemple, les chimères entre la (les) dite(s) 15 fonction(s) adhésive(s) et la SAH mature possèdent des propriétés pharmacocinétiques et des activités antithrombotiques particulièrement utiles en thérapeutique.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation des molécules chimères décrites ci-dessus. Plus précisément, ce procédé consiste à faire 20 exprimer par un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide désiré, puis à récolter le polypeptide produit.

Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, 25 Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc... Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries telles que Escherichia coli, ou appartenant aux genres 30 Corynebacterium, Bacillus, ou Streptomyces.

Les séquences nucléotidiques utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être préparées de différentes manières. Généralement, elles sont

obtenues en assemblant en phase de lecture les séquences codant pour chacune des parties fonctionnelles du polypeptide. Celles-ci peuvent être isolées par les techniques de l'homme de l'art, et par exemple directement à partir des ARN messagers (ARNm) cellulaires, ou par reclonage à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) effectuée à partir de cellules productrices, ou encore il peut s'agir de séquences nucléotidiques totalement synthétiques. Il est entendu de plus que les séquences nucléotidiques peuvent également être ultérieurement modifiées, par exemple par les techniques du génie génétique, pour obtenir des dérivés ou des variants desdites séquences.

Plus préférentiellement, dans le procédé de l'invention, la séquence nucléotidique fait partie d'une cassette d'expression comprenant une région d'initiation de la transcription (région promoteur) permettant, dans les cellules hôtes, l'expression de la séquence nucléotidique placée sous son contrôle et codant pour les polypeptides de l'invention. Cette région peut provenir de régions promoteurs de gènes fortement exprimés dans la cellule hôte utilisée, l'expression étant constitutive ou régulable. S'agissant de levures, il peut s'agir du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), de la lactase (LAC4), des énolases (ENO), des alcools deshydrogénases (ADH), etc... S'agissant de bactéries, il peut s'agir du promoteur des gènes droit ou gauche du bactériophage lambda (PL, PR), ou encore des promoteurs des gènes des opérons tryptophane (P_{trp}) ou lactose (P_{lac}). En outre, cette région de contrôle peut être modifiée, par exemple par mutagénèse in vitro, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. La cassette d'expression peut également comprendre une région de terminaison de la transcription fonctionnelle dans l'hôte envisagé, positionnée immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention.

Dans un mode préféré, les polypeptides de l'invention résultent de l'expression dans un hôte eucaryote ou procaryote d'une séquence nucléotidique et de la sécrétion du produit d'expression de ladite séquence dans le milieu de culture. Il est en effet particulièrement avantageux de pouvoir obtenir par voie recombinante des molécules directement dans le milieu de culture. Dans ce cas, la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention est précédée d'une séquence "leader" (ou séquence signal) dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de

sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence signal naturelle du vWF ou de la structure stabilisatrice dans le cas où celle-ci est une protéine naturellement sécrétée, mais il peut également s'agir de toute autre séquence "leader" fonctionnelle, ou d'une séquence "leader" artificielle. Le choix de l'une ou 5 l'autre de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé. Des exemples de séquences signal fonctionnelles incluent celles des gènes des phéromones sexuelles ou des toxines "killer" de levures.

En plus de la cassette d'expression, un ou plusieurs marqueurs permettant 10 de sélectionner l'hôte recombiné peuvent être additionnés, tels que par exemple le gène URA3 de la levure S. cerevisiae, ou des gènes conférant la résistance à des antibiotiques comme la génétidine (G418) ou à tout autre composé毒ique comme certains ions métalliques.

L'ensemble constitué par la cassette d'expression et par le marqueur de 15 sélection peut être introduit, soit directement dans les cellules hôtes considérées, soit inséré préalablement dans un vecteur autoréplicatif fonctionnel. Dans le premier cas, des séquences homologues à des régions présentes dans le génome des cellules hôtes sont préférentiellement additionnées à cet ensemble; lesdites séquences étant alors positionnées de chaque côté de la cassette d'expression et du gène de sélection de façon à augmenter la fréquence d'intégration de l'ensemble dans le génome de l'hôte 20 en ciblant l'intégration des séquences par recombinaison homologue. Dans le cas où la cassette d'expression est insérée dans un système réplicatif, un système de réplication préféré pour les levures du genre Kluyveromyces est dérivé du plasmide pKD1 initialement isolé de K. drosophilarum; un système préféré de réplication pour les levures du genre Saccharomyces est dérivé du plasmide 2μ de S. cerevisiae. De 25 plus, ce plasmide d'expression peut contenir tout ou partie desdits systèmes de réplication, ou peut combiner des éléments dérivés du plasmide pKD1 aussi bien que du plasmide 2μ .

En outre, les plasmides d'expression peuvent être des vecteurs navettes entre un hôte bactérien tel que Escherichia coli et la cellule hôte choisie. Dans ce 30 cas, une origine de réplication et un marqueur de sélection fonctionnant dans l'hôte bactérien sont requises. Il est également possible de positionner des sites de restriction entourant les séquences bactériennes et uniques sur le vecteur d'expression : ceci permet de supprimer ces séquences par coupure et religature *in vitro* du vecteur tronqué avant transformation des cellules hôtes, ce qui peut résulter

en une augmentation du nombre de copies et en une stabilité accrue des plasmides d'expression dans lesdits hôtes. Par exemple, de tels sites de restriction peuvent correspondre aux séquences telles que 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) ou 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) dans la mesure où ces sites sont extrêmement rares et 5 généralement absents d'un vecteur d'expression.

Après construction de tels vecteurs ou cassette d'expression, ceux-ci sont introduits dans les cellules hôtes retenues selon les techniques classiques décrites dans la littérature. A cet égard, toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule peut être utilisée. Il peut s'agir notamment de 10 transformation, électroporation, conjugaison, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. A titre d'exemple pour les hôtes de type levure, les différentes souches de Kluyveromyces utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. [J. Bacteriol. 153 (1983) 163]. La technique de 15 transformation décrite par Durrens et al. [Curr. Genet. 18 (1990) 7] utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, selon la méthode décrite par Karube et al. [FEBS Letters 182 (1985) 90]. Un protocole alternatif est également décrit en détail dans les exemples qui suivent.

20 Après sélection des cellules transformées, les cellules exprimant lesdits polypeptides sont inoculées et la récupération desdits polypeptides peut être faite, soit au cours de la croissance cellulaire pour les procédés "en continu", soit en fin de croissance pour les cultures "en lots" ("batch"). Les polypeptides qui font l'objet de la présente invention sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture en vue de 25 leur caractérisation moléculaire, pharmacocinétique et antithrombotique.

Un système d'expression préféré des polypeptides de l'invention consiste en l'utilisation des levures du genre Kluyveromyces comme cellule hôte, transformées par certains vecteurs dérivés du réplicon extrachromosomique pKD1 initialement isolé chez K. marxianus var. drosophilicarum. Ces levures, et en particulier K. lactis et 30 K. fragilis sont généralement capables de répliquer lesdits vecteurs de façon stable et possèdent en outre l'avantage d'être incluses dans la liste des organismes G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe"). Des levures privilégiées sont préférentiellement

des souches industrielles du genre Kluyveromyces capables de répliquer de façon stable lesdits plasmides dérivés du plasmide pKD1 et dans lesquels a été inséré un marqueur de sélection ainsi qu'une cassette d'expression permettant la sécrétion à des niveaux élevés des polypeptides de l'invention.

5 La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides chimères décrits ci-avant, ainsi que les cellules recombinantes, eucaryotes ou procaryotes, comprenant de telles séquences.

10 La présente invention concerne aussi l'application à titre de médicament des polypeptides selon la présente invention. Plus particulièrement, l'invention a pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides tel que décrit ci-avant. Plus particulièrement, ces compositions peuvent être utilisées pour la prévention ou le traitement des thromboses.

15 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

15 LISTE DES FIGURES

Les représentations des plasmides indiquées dans les Figures suivantes ne sont pas traçées à l'échelle et seuls les sites de restriction importants pour la compréhension des clonages réalisés ont été indiqués.

Figure 1 : Séquence nucléotidique d'un fragment de restriction HindIII 20 codant pour une protéine chimère du type SAH-vWF. Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Les sites de restriction MstII et PstI sont soulignés. La numérotation des acides aminés (colonne de droite) correspond à la protéine chimère SAH-vWF470->713 mature (829 résidus) ; le fragment Thr470-Val713 du vWF de cette chimère particulière est numéroté des résidus Thr586 à 25 Val829. Les résidus Thr470, Leu494, Asp498, Pro502, Tyr508, Leu694, Pro704, et Pro708 du vWF mature sont soulignés.

Figure 2 : Schématisation des chimères du type SAH-vWF (A), du type vWF-SA (B) ou vWF-SA-vWF (C). Abréviations utilisées : M/LP, résidu méthionine initiateur de la traduction, éventuellement suivi d'une séquence signal de 30 sécrétion ; SAH, sérum-albumine humaine mature ou un de ses variants ; vWF,

fragment(s) du vWF possédant une propriété de fixation aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, ou un (des) variants obtenus par les techniques du génie génétique. La flèche noire indique l'extrémité N-terminale de la protéine mature.

Figure 3 : A, carte de restriction du plasmide pYG105 et stratégie de construction des plasmides d'expression des protéines chimères de la présente invention. Abréviations utilisées : P, promoteur transcriptionnel ; T, terminateur transcriptionnel ; IR, séquences répétées inversées du plasmide pKD1 ; LPSAH, région "prépro" de la SAH; Ap^r et Km^r désignent respectivement les gènes de résistance à l'ampicilline (*E. coli*) et au G418 (levures).

B, caractéristiques et filiation génétiques des principaux plasmides d'expression des hybrides entre SAH et vWF exemplifiés dans la présente invention. Les plasmides de la première colonne sont des plasmides de type pUC comportant un fragment de restriction HindIII correspondant à des fusions traductionnelles entre la totalité de la SAH et un fragment ou un variant moléculaire du vWF. Les plasmides d'expression correspondent au clonage dans l'orientation productive de ces fragments HindIII dans le site HindIII du plasmide pYG105 (LAC4).

Figure 4 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1248 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P1-X-P2) et pKan707 (plasmide contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5%) puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2) ; surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre l'albumine humaine: surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 2) ou YPL (piste 3).

Figure 5 : Cinétique de sécrétion d'une chimère du type SAH-P2 par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206.

A, coloration au bleu de coomassie ; standard de poids moléculaire (piste 1) : surnageant équivalent à 2,5 µl d'une culture "Fed Batch" en milieu YPD après 24h. 5 (piste 2), 40h. (piste 3) ou 46h. (piste 4) de croissance.

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

Figure 6 : Caractérisation du matériel sécrété par *K. lactis* transformé 10 par les plasmides pKan707 (plasmide contrôle, piste 2), pYG1206 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P2, piste 3), pYG1214 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P1, piste 4) et pYG1223 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P1-XD-P2, piste 5) ; standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts correspondent à 50 µl de surnageant d'une culture 15 stationnaire après croissance en milieu YPD, migration dans un gel à 8.5 % d'acrylamide et coloration au bleu de coomassie.

Figure 7 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1311 20 (SAH-vWF508->704) et pYG1313 (SAH-vWF470->704, C471G, C474G), après migration sur gel SDS-PAGE à 8,5 %.

A, coloration au bleu de coomassie; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1311 (piste 1) ou pYG1313 (piste 2) en milieu YPL ; standard de poids moléculaire (piste 3).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation 25 d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre la SAH : même légende qu'en A.

Figure 8 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1361 30 (SAH-vWF470->704, C471G, C474G, R543W) et pYG1365 (SAH-vWF470->704, C471G, C474G, P574L), après migration sur gel SDS-PAGE à 8,5 %. Dans cette

expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1361 (piste 1) ou pYG1365 (piste 2) en 5 milieu YPL; standard de poids moléculaire (piste 3).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre la SAH : même légende qu'en A.

10 **Figure 9 :** Dosage de l'activité antagoniste *in vitro* de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au paraformaldéhyde : CI50 des hybrides SAH-vWF694-708, [SAH-vWF470-713 C471G, C474G] et [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] relativement à l'étalon RG12986. La détermination de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination plaquettaire est réalisée sous agitation à 37°C, en utilisant un 15 agrégamètre PAP-4, en présence de vWF humain, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions. La concentration du produit permettant d'inhiber de moitié l'agglutination contrôle (absence de produit) est alors déterminée (CI50).

EXEMPLES

20 TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction 25 de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli* etc... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. 30 (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

5 Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

10 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un 15 traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

20 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

25 La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

La numérotation des acides aminés du vWF est celle de Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184].

30 Les transformations de K. lactis avec l'ADN des plasmides d'expression des protéines de la présente invention sont effectuées par toute technique connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont E. coli MC1060 (lacIPOZYA, X74, galU, galK, strA^r), ou E. coli TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5 / FtraD36, proA^rB^r, lacI^q, lacZ, M15).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre Kluyveromyces. Les souche K. lactis MW98-8C (a, uraA, arg, lys, K⁺, pKD1^o) et K. lactis CBS 293.91 ont été particulièrement utilisées; un échantillon de la souche MW98-8C a été déposé le 16 5 Septembre 1988 au Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) à Baarn (Pays Bas) où il a été enregistré sous le numéro CBS 579.88.

Une souche bactérienne (E. coli) transformée avec le plasmide pET-8c52K a été déposée le 17 Avril 1990 auprès de l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 68306.

10 Les souches de levures transformées par les plasmides d'expression codant pour les protéines de la présente invention sont cultivées en erlenmeyers ou en fermentateurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD: 1 % yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % glucose ; ou YPL : 1 % yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % lactose) sous agitation constante.

15 **EXEMPLE 1: CONSTRUCTION DU PLASMIDE pET-8c52K ET DE SES VARIANTS MOLECULAIRES**

Le fragment du cDNA du vWF codant pour les résidus 445 à 733 du vWF humain possède plusieurs déterminants cruciaux de l'interaction entre le vWF et les plaquettes d'une part, et certains éléments de la membrane basale et du tissu sous-endothelial d'autre part. L'amplification de ces déterminants génétiques peut être réalisée, par exemple à partir d'une lignée cellulaire humaine exprimant le vWF, et par exemple d'une lignée de cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain [Verweij C.L. et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4699-4717], ou encore à partir d'ARN de plaquettes humaines, par exemple selon le protocole décrit par Ware et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 2946-2950]. Les ARN cellulaires sont purifiés en utilisant la technique d'extraction au thiocyanate de guanidium initialement décrite par Cathala et al. [DNA 4 (1983) 329-335] et utilisés comme matrice à la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) incluant la partie du vWF à amplifier. Dans un premier temps, la synthèse du brin non codant se fait en utilisant 20 le kit distribué par Amersham et un oligodéoxynucléotide complémentaire de la séquence nucléotidique de l'ARNm codant pour des résidus contigus localisés en C-terminal de la partie à amplifier. La solution résultante est ensuite soumise à 30 cycles d'amplification enzymatique par la technique PCR, en utilisant comme

amorce l'oligodéoxynucléotide précédent et un oligodéoxynucléotide identique à la séquence nucléotidique codant pour des résidus contigus localisés en N-terminal de la partie du vWF à amplifier. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans des vecteurs du type M13 en vue de leur vérification par séquençage en utilisant soit les 5 amorces universelles situées de part et d'autre du multisite de clonage, soit des oligodéoxynucléotides spécifiques de la région amplifiée du gène du vWF dont la séquence de plusieurs isomorphes est connue [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398 ; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847 ; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171 ; Bontron D. et al., 10 Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127]. Le plasmide pET-8c52K est particulièrement utile car il comporte un fragment du cDNA du vWF codant pour les résidus 445 à 733 du vWF humain et inclus notamment les peptides G10 et D5 antagonistes de l'interaction entre vWF et GP1b [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Le fragment du vWF présent dans le plasmide p5E est 15 identique au fragment du vWF du plasmide pET-8c52K à l'exception que les résidus cystéine aux positions 459, 462, 464, 471 et 474 ont été mutés en résidus glycine par mutagénèse dirigée. Le plasmide p7E est identique au plasmide p5E à l'exception que les résidus cystéine aux positions 509 et 695 ont également été mutés en résidus glycine par mutagénèse dirigée.

20 EXEMPLE 2: CONSTRUCTION D'UN FRAGMENT DE RESTRICTION
MSTII-HINDIII INCLUANT UN SITE DE LIAISON DU vWF AUX PLAQUETTES SANGUINES

E.2.1. Peptide du type P1-X-P2.

E.2.1.1. Résidus Thr470-Val713 du vWF.

25 L'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGGGATCCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, les sites BamHI et MstII sont soulignés) et 5'-CCCGGGATCCAAGC-TTAGACTTGTGCCATGTCG-3' (Sq2029, les sites BamHI et HindIII sont soulignés), génère un fragment incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF (cf. 30 Figure 1, résidus Thr586 à Val829). Les fragments amplifiés sont d'abord coupés par BamHI, clonés dans le site BamHI d'un vecteur de type pUC et la séquence d'un clone est vérifiée par séquençage. La séquence peptidique ainsi amplifiée comporte un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du

vWF et dont la séquence peptidique est identique à la séquence correspondante décrite par Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Le plasmide pYG1220 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

5 E.2.1.2. Résidus Thr470-Pro704 du vWF.

Le résidu 705 du vWF naturel est O-glycosylé et se situe à l'intérieur du peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. De plus il est connu qu'un traitement du vWF naturel par une neuraminidase, dont la fonction est de libérer les acides sialiques terminaux des glycosylations des cellules de mammifères, permet d'exposer les sites de liaisons du vWF à la GPIb plaquettaire en l'absence de cofacteurs de l'agglutination plaquettaire tel que la botrocétine par exemple. Il est donc possible que la suppression de tout ou partie des sites de O-glycosylation du vWF recombinant, et notamment sécrété par une levure dont il est admis que la O-glycosylation est dépourvue d'acides sialiques, génère un produit intrinsèquement capable de reconnaître la GPIb plaquettaire en l'absence de tels cofacteurs. Un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Pro704 du vWF est donc généré de façon similaire à l'exemple précédent: les fragments résultant de l'amplification PCR du plasmide p5E avec les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGG-GATCCCTTAGGCTAACCGGTGAAGCCGGC-3' (Sq2149, les sites BamHI et MstII sont soulignés) et 5'-CCATGGATCCAAGCTTAAGGGAGGGAGGGCTTCAGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) sont d'abord clonés dans un vecteur de type pUC sous la forme d'un fragment de restriction BamHI, et la séquence d'un clone est vérifiée par séquençage. La séquence du fragment MstII-HindIII ainsi généré corresponds à la séquence correspondante donnée à la Figure 1 à l'exception que le codon TAA spécifiant l'arrêt traductionnel est localisé immédiatement en aval du résidu Pro704 du vWF et que les résidus 471 et 474 sont des résidus glycine et non des résidus cystéine. Le plasmide pYG1310 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

30 E.2.1.3. Résidus Leu494-Pro704 du vWF.

La séquence peptidique présente dans le plasmide pYG1310 possède encore les résidus thréonine ou sérine aux positions 485, 492, 493 et 500 qui sont naturellement O-glycosylés dans la molécule native du vWF humain, localisés à

proximité immédiate du peptide G10 défini par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. L'amplification par la technique PCR du plasmide pET8C-52K par les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGGGTACCTAGG-CTTACTGTATGTGGAGGGACATC-3' (Sq3037, les sites KpnI et MstII sont soulignés) et 5'-CCATGGATCCAAAGCTTAAGGAGGGAGGGCTTCAGGGGC-AAGGTC-3' (Sq2622, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) génère un fragment incluant les résidus Leu494 à Pro704 du vWF. Les fragments amplifiés sont d'abord coupés par les enzymes KpnI et BamHI pour être clonés dans un vecteur de type pUC coupé par les mêmes enzymes. Un clone particulier est isolé qui correspond à la séquence attendue vérifiée par séquençage. Ce fragment KpnI-BamHI comporte donc un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Leu494 à Pro704 du vWF humain. Le plasmide pYG1373 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.1.4. Résidus Tyr508-Pro704 du vWF.

La séquence peptidique présente après amplification PCR dans le plasmide pYG1373 possède encore le résidu thréonine à la position 500 qui est naturellement O-glycosylé dans la molécule native du vWF humain. L'amplification par la technique PCR du plasmide pET8C-52K par les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGG-GTACCTAGGCTTACTGCAGCAGGCTACTGGACCTG-3' (Sq2621, les sites KpnI et MstII sont soulignés) et 5'-CCATGGATC-CAAGCTTAAGGAGGGAGGGCTTCAGGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) génère un fragment incluant les résidus Tyr508 à Pro704 du vWF. Les fragments amplifiés sont d'abord coupés par les enzymes KpnI et BamHI pour être clonés dans un vecteur de type pUC coupé par les mêmes enzymes. Un clone particulier est isolé qui correspond à la séquence attendue vérifiée par séquençage. Ce fragment KpnI-BamHI comporte donc un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Tyr508 à Pro704 du vWF humain. Le plasmide pYG1309 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.1.5. Résidus Pro502-Pro704 du vWF.

La séquence peptidique correspondant aux résidus Pro502 à Pro704 du vWF humain est générée à partir du plasmide précédent par insertion des oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGGTTACCACCTTGCATGACTTACTGCA-3'

(Sq2751) et 5'-GTAGAAGTCATGCAAAGGTGGTAACCC-3' (Sq2752) qui en s'appariant peuvent être clonés entre les sites MstII et PstI du plasmide obtenu après amplification PCR selon l'exemple E.2.1.4., ce qui permet de générer un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Pro502 à Pro704 du vWF humain. Le 5 plasmide pYG1350 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.2. Résidus Thr470-Asp498 du vWF: peptide du type P1.

Dans un mode de réalisation particulier, le site de liaison du vWF est un peptide incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF mature. Cette séquence inclus 10 le peptide G10 (Cys474-Pro488) décrit par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904] et capable d'antagoniser l'interaction du vWF humain à la GP1b des plaquettes humaines. La séquence incluant le peptide G10 est d'abord générée sous 15 la forme d'un fragment de restriction MstII-HindIII, par exemple au moyen de la technique d'amplification PCR, ou encore directement à l'aide d'oligodéoxynucléotides synthétiques. Par exemple, les produits de l'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et 5'-CCCG-GGATCCAAGCTTAGTCCTCCACATACAG-3' (Sq1970, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) sont d'abord coupés par l'enzyme BamHI puis clonés dans le site BamHI d'un vecteur de type pUC. Un clone particulier est isolé qui corresponds 20 à la séquence attendue vérifiée par séquençage. Ce fragment BamHI comporte donc un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF humain. Le plasmide pYG1210 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.3. Résidus Leu694-Pro708 du vWF: peptide du type P2.

Dans un second mode de réalisation, le site de liaison du vWF à la GP1b est 25 directement conçu à l'aide d'oligodéoxynucléotides synthétiques, et par exemple les oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCCTG-AAGCCCCCTCCTACTCTGCCCTAAGCTTA-3' et 5'-GATC-TAAGCTTAGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGCTTCAGGGCAAGGTC-30 ACAGAGGCC-3'. Ces oligodéoxynucléotides forment en s'appariant un fragment de restriction MstII-BglII incluant le fragment MstII-HindIII correspondant au peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Le plasmide pYG1204 comporte ce fragment de

restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.4. Peptide du type P1-XD-P2.

Des variants utiles du plasmide pET-8c52K sont délétrés par mutagénèse dirigée entre les peptides G10 et D5, par exemple des sites de fixation au collagène, et/ou à l'héparine, et/ou à la botrocétine, et/ou aux sulfatides et/ou à la ristocétine. Un exemple est le plasmide pMMB9 délétré par mutagénèse dirigée entre les résidus Cys509 et Ile662. L'amplification PCR de ce plasmide avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et Sq2029 génère un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Tyr508 et Arg663 à Val713 et en particulier les peptides G10 et D5 du vWF et délétré en particulier de son site de fixation au collagène localisé entre les résidus Glu542 et Met622 [Roth G.J. et al. Biochemistry 25 (1986) 8357-8361]. Le plasmide pYG1217 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B). Dans d'autres modes de réalisation, l'utilisation des techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permet de générer à volonté des variants du fragment de restriction MstII-HindIII de la Figure 1 mais délétrés d'un ou plusieurs sites de fixation aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène.

20 E.2.5. Peptide du type P1-X*-P2.

E.2.5.1. Altération conformationnelle par substitution des résidus cystéine.

Les produits de l'amplification PCR des plasmides p5E et p7E avec les oligodéoxynucléotides Sq2149 (5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTAACCGGTG-AAGCCGGC-3', les sites BamHI et MstII sont soulignés) et Sq2029 sont d'abord clonés dans un vecteur de type pUC sous la forme d'un fragment de restriction BamHI, et la séquence d'un clone est vérifiée par séquençage. La séquence du fragment MstII-HindIII ainsi généré correspond à la séquence correspondante donnée à la Figure 1 à l'exception que les résidus 471 et 474 du vWF sont des résidus glycine et non des résidus cystéine. Le plasmide pYG1271 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B). Le plasmide pYG1269 est généré

de façon similaire à l'exception que le plasmide p7E est utilisé comme matrice lors de l'amplification PCR par les oligodéoxynucléotides Sq2149 et Sq2029.

E.2.5.2. Altération conformationnelle par introduction de mutations du type IIB

5 D'autres mutations particulièrement utiles concernent au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type IIB associées au vWF (augmentation de l'affinité intrinsèque du vWF pour la GP1b), comme les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val551, Val553, Pro574 ou Arg578 par exemple. Les techniques de recombinaison génétique *in vitro* permettent également d'introduire à volonté un ou 10 des résidus supplémentaires dans la séquence du vWF et par exemple une méthionine surnuméraire entre les positions Asp539 et Glu542. Dans une exemplification particulière, les mutations Arg543->Trp543 (R543W) et Pro574->Leu574 (P574L) sont introduites par mutagénèse dirigée à l'aide des oligodéoxynucléotides 5'-GTGCTGAAGGCCTTGTCGACATGATGGA-
15 GTGGCTGCGGATATCCCAGAAGTAGGGTAGCGGTGGCCGTGGTGG-
GTACC-3' (Sq2851; le codon spécifiant le résidu Arg543 est souligné) et 5'-
GGGCTCAAGGACCGGAAGCGCTTAAGCGAGCTGCGGCGCATTGCC-
AGCCAG-3' (Sq2855; le codon spécifiant le résidu Leu574 est souligné), 20 respectivement. Après vérification de la séquence nucléotidique, on génère ainsi des fragments de restriction MstII-HindIII incluant les mutants de type IIB du vWF humain R543W et P574L. Les plasmides pYG1359 (R543W) et pYG1360 (P574L) comportent ces fragments de restriction MstII-HindIII précédés du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B). La mutagénèse à l'aide de l'oligodéoxynucléotide Sq2851 introduit également les sites SalI, EcoRV et 25 MluI aux positions Val538, Ile546 et Val551, respectivement. Ces sites de restriction ne sont pas présents dans la séquence correspondante naturelle du vWF humain et sont donc particulièrement utiles pour introduire facilement toute mutation désirable entre les résidus Val538 et Val551. A titre d'exemple, les oligodéoxynucléotides 5'-ATCCCAGAAGTGCGTA-3' (Sq3017, le codon spécifiant 30 le mutant de type IIB Cys550 est souligné) et 5'-CGCGTACGCACTTCTGGGAT-3' (Sq3018) forment en s'appariant un fragment de restriction EcoRV-MluI qui peut être cloné dans le plasmide pYG1359 coupé par les enzymes EcoRV et MluI, ce qui génère le plasmide pYG1374 comportant les mutations R543W et W550C (Figure 3B). De la même façon, les oligodéoxynucléotides 5'-

TCGACATGATGGAGCGGCTGCGGAT-3' (Sq3019, le codon spécifiant le résidu Arg543 provenant de la séquence naturelle est souligné) et 5'-ATCCGCAGCCGCTCCATCATG-3' (Sq3020) forment en s'appariant un fragment de restriction SalI-EcoRV qui peut être cloné dans le plasmide pYG1374 coupé par les enzymes SalI et EcoRV, ce qui génère le plasmide pYG1386 qui ne comporte que la mutation W550C (Figure 3B).

EXEMPLE 3: CONSTRUCTION D'UN FRAGMENT DE RESTRICTION MstII/HindIII INCLUANT UN SITE DE LIAISON DU vWF AU SOUS-ENDOTHELIUM

Dans un mode de réalisation particulier, les sites de liaison du vWF aux composants du tissu sous-endothélial et du collagène en particulier, sont générés par amplification PCR du plasmide pET-8c52K. Par exemple l'utilisation des oligodéoxynucléotides Sq2258 (5'-GGATCCTTAGGGCTGTG-TGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', le site MstII est souligné) et Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTAACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', le site HindIII est souligné) permet de générer le plasmide pYG1254 dont le fragment de restriction MstII-HindIII inclus les résidus Cys509 à Cys695 du vWF naturel (peptide de type X). La ligature de ce fragment de restriction avec le fragment de restriction HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4) génère le fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1276 (Figure 3B).

Des variants moléculaires des types XD (cf. E.2.4.) ou X* (cf. E.2.5.) peuvent également être générés selon la même stratégie et qui comportent toute combinaison souhaitable entre les sites de fixation du vWF aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène et/ou tout résidu responsable d'une modification de l'affinité du vWF pour la GP1b (pathologies de type II associée au vWF). Dans un autre mode de réalisation, le domaine capable de se fixer au collagène peut également provenir du fragment du vWF compris entre les résidus 911 et 1114 et décrit par Paret et al. [J. Biol. Chem. (1987) 262: 13835-13841].

EXEMPLE 4: COUPLAGE EN C-TERMINAL DE LA SAH

Le plasmide pYG404 est décrit dans la demande de brevet EP 361 991. Ce plasmide comporte un fragment de restriction HindIII codant pour le gène de la prépro-SAH précédé des 21 nucléotides naturellement présents immédiatement en

amont de l'ATG initiateur de traduction du gène PGK de S. cerevisiae. Ce fragment comporte un fragment de restriction HindIII-MspII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (résidus leucine-glycine-leucine). La ligature de ce fragment avec l'un quelconque 5 des fragments MspII-HindIII décrits dans les exemples 2 ou 3 permet de générer des fragments de restriction HindIII incluant des gènes composites codant pour des protéines chimères dans lesquelles un fragment du vWF doué de propriétés particulières est positionné en phase traductionnelle de lecture en C-terminal de la 10 molécule de SAH. De tels gènes composites sont exemplifiés dans le Tableau de la Figure 3B.

EXEMPLE 5: COUPLAGE EN N-TERMINAL DE LA SAH

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre 15 un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant un fragment du vWF doué de propriétés d'adhésivité et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction 20 par des sites de restriction HindIII ce qui permet de générer des plasmides d'expression de ces protéines chimères, par exemple selon la stratégie détaillée dans l'exemple suivant.

EXEMPLE 6: PLASMIDES D'EXPRESSION

Les protéines chimères des exemples précédents peuvent être exprimées dans les levures à partir de promoteurs fonctionnels, régulables ou constitutifs, tels que, 25 par exemple, ceux présents dans les plasmides pYG105 (promoteur LAC4 de Kluyveromyces lactis), pYG106 (promoteur PGK de Saccharomyces cerevisiae), pYG536 (promoteur PHO5 de S. cerevisiae), ou des promoteur hybrides tels que ceux décrits dans la demande de brevet EP 361 991. Les plasmides pYG105 et 30 pYG106 sont ici particulièrement utiles car ils permettent l'expression des gènes codés par les fragments de restriction HindIII des exemples E.4. et E.5. à partir de promoteurs fonctionnels chez K. lactis, régulables (pYG105) ou constitutifs (pYG106). Le plasmide pYG105 corresponds au plasmide pKan707 décrit dans la

demande de brevet EP 361 991 dans lequel le site de restriction HindIII unique et localisé dans le gène de résistance à la génétidine (G418) a été détruit par mutagénèse dirigée tout en conservant une protéine inchangée (oligodeoxynucléotide 5'-GAAATGCATAAGCTCTGCCATTCTCACCG-3'). Le fragment SalI-SacI codant pour le gène URA3 du plasmide muté a été ensuite remplacé par un fragment de restriction SalI-SacI comportant une cassette d'expression constituée du promoteur LAC4 de K. lactis (sous la forme d'un fragment SalI-HindIII) et du terminateur du gène PGK de S. cerevisiae (sous la forme d'un fragment HindIII-SacI). Le plasmide pYG105 est mitotiquement très stable chez les levures Kluyveromyces et une carte de restriction en est donnée à la Figure 3. Les plasmides pYG105 et pYG106 ne diffèrent entre eux que par la nature du promoteur de transcription encodé par le fragment SalI-HindIII. A titre d'exemple, le clonage, "dans l'orientation productive" (définie comme l'orientation qui place la région "prépro" de l'albumine de façon proximale par rapport au promoteur de transcription), des fragments de restriction HindIII des plasmides pYG1220, pYG1310, pYG1373, pYG1309, pYG1350, pYG1210, pYG1204, pYG1217, pYG1269, pYG1271, pYG1359, pYG1360, pYG1374, pYG1386 et pYG1276, dans le site HindIII du plasmide pYG105 génère respectivement les plasmides d'expression pYG1248, pYG1313, pYG1375, pYG1311, pYG1355, pYG1214, pYG1206, pYG1223, pYG1279, pYG1283, pYG1361, pYG1365, pYG1377, pYG1389 et pYG1277.

EXEMPLE 7: TRANSFORMATION DES LEVURES

La transformation des levures appartenant au genre Kluyveromyces, et en particulier les souches MW98-8C et CBS 293.91 de K. lactis, s'effectue par exemple par la technique de traitement des cellules entières par de l'acétate de lithium [Ito H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168], adaptée comme suit. La croissance des cellules se fait à 28°C dans 50 ml de milieu YPD, avec agitation et jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) comprise entre 0,6 et 0,8 ; les cellules sont récoltées par centrifugation à faible vitesse, lavées dans une solution stérile de TE (10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA), resuspendues dans 3-4 ml d'acétate lithium (0,1 M dans le TE) pour obtenir une densité cellulaire d'environ 2 x 10⁸ cellules/ml, puis incubées à 30°C pendant 1 heure sous agitation modérée. Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension résultante de cellules compétentes sont incubés

à 30°C pendant 1 heure en présence d'ADN et à une concentration finale de 35 % de polyéthylène glycol (PEG4000, Sigma). Après un choc thermique de 5 minutes à 42°C, les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 0,2 ml d'eau stérile et incubées 16 heures à 28°C dans 2 ml de milieu YPD pour permettre l'expression 5 phénotypique du gène de résistance au G418 exprimé sous contrôle du promoteur P_{k1} (cf. EP 361 991) ; 200 µl de la suspension cellulaire sont ensuite étalés sur boites YPD sélectives (G418, 200 µg/ml). Les boites sont mises à incuber à 28°C et les transformants apparaissent après 2 à 3 jours de croissance cellulaire.

EXEMPLE 8: SECRETION DES CHIMERES

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter les protéines chimères entre SAH et vWF. Quelques clones correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple, avec les plasmides pYG1214 (SAH-P1), pYG1206 (SAH-P2), pYG1223 (SAH-P1-XD-P2) et pYG1248 (SAH-P1-X-P2) ou pKan707 (vecteur témoin) sont mis à incuber en milieu YPD ou YPL à 28°C. Les surnageants cellulaires sont récupérés par centrifugation quand les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance, éventuellement concentrés 10 fois par précipitation pendant 30 minutes à -20°C dans une concentration finale de 60 % d'éthanol, puis 10 testés après électrophorèse en gel SDS-PAGE à 8.5 %, soit directement par coloration du gel par du bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires des anticorps de souris dirigés contre le vWF ou un 15 serum polyclonal de lapin dirigé contre la SAH. Lors des expériences de détection immunologique, le filtre de nitrocellulose est d'abord incubé en présence des anticorps primaires spécifiques, lavé plusieurs fois, incubé en présence d'anticorps 20 de chèvre anti-souris (immunoblot anti-vWF) ou anti-lapin (immunoblot anti-SAH), puis incubé en présence d'un complexe avidine-péroxydase en utilisant le "kit ABC" distribué par Vectastain (Biosys S.A., Compiègne, France). La réaction 25 immunologique est ensuite révélée par addition de diamino-3,3' benzidine tetrachlorhydrate (Prolabo) en présence d'eau oxygénée, selon les recommandations du fabricant. Les résultats des Figures 4 à 8 démontrent que la levure K. lactis est 30 capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces chimères sont reconnues par des anticorps spécifiques de la SAH ou du vWF.

EXEMPLE 9: PURIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES PRODUITS SECRETES

Les chimères présentes dans les surnageants de culture correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple par les plasmides d'expression selon l'exemple 6, sont caractérisées dans un premier temps à l'aide d'anticorps spécifiques de la partie SAH et de la partie vWF. Les résultats des Figures 4 à 8 démontrent que la levure K. lactis est capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces chimères sont immunologiquement réactives. Il peut être également souhaitable de purifier certaines de ces chimères. La culture est alors centrifugée (10000 g, 30 min), le surnageant est passé à travers un filtre de 0,22 mm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8) puis purifié sur colonne. Par exemple, le concentrat correspondant au surnageant de culture de la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 est purifiée par chromatographie d'affinité sur Bleu-Trisacryl (IBF). Une purification par chromatographie d'échange d'ions peut également être utilisée. Par exemple dans le cas de la chimère SAH-vWF470-713, le concentrat obtenu après ultrafiltration est dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse de cations (S Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La colonne est alors lavée plusieurs fois par la solution de Tris HCl (50 mM pH 8) et la protéine chimère est alors éluee de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 8) puis redéposées sur colonne S Fast Flow. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] sécrétée par la levure CBS 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 1). Le caractère essentiellement monomérique des protéines chimères entre SAH et vWF est également confirmé par leur profil d'élution sur colonne TSK 3000 [Toyo Soda Company, équilibrée par une solution de cacodylate (pH 7) contenant 0,2 M de Na₂SO₄] : par exemple la chimère [SAH-vWF 470-704 C471G,

C474G] se comporte dans ces conditions comme une protéine de poids moléculaire apparent de 95 kDa démontrant son caractère monomérique.

EXEMPLE 10: ACTIVITE ANTAGONISTE DES HYBRIDES GENETIQUES ENTRE SAH ET vWF POUR L'AGGLUTINATION PLAQUETTAIRE

5 L'activité antagoniste des produits est déterminée par mesure de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au paraformaldéhyde selon la méthode décrite par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66]. Les mesures se font dans un agrégamètre (PAP-4, Bio Data, Horsham, PA, USA) qui enregistre les variations au cours du temps de la transmission optique sous 10 agitation à 37°C en présence de vWF, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions (concentrations). Pour chaque mesure, 400 ml (8×10^7 plaquettes) d'une suspension de plaquettes humaines stabilisées au paraformaldéhyde (0,5 %, puis resuspendues en [NaCl (137 mM) ; MgCl₂ (1 mM) ; NaH₂PO₄ (0,36 mM) ; NaHCO₃ (10 mM) ; KCl (2,7 mM) ; glucose (5,6 mM) ; SAH (3,5 mg/ml) ; 15 tampon HEPES (10 mM, pH 7,35)]) sont préincubés à 37°C dans la cuve cylindrique (8,75 x 50 mm, Wellcome Distriwell, 159 rue Nationale, Paris) de l'agrégamètre pendant 4 min puis sont additionnés de 30 ml de la solution du produit à tester à différentes dilutions dans du véhicule de formulation apyrogène [mannitol (50 g/l) ; acide citrique (192 mg/l) ; L-lysine monochlorhydratée (182,6 mg/l) ; NaCl (88 mg/l) ; pH ajusté à 3,5 par addition de NaOH (1M)], ou de véhicule de formulation uniquement (essai contrôle). La suspension résultante est alors incubée pendant 1 min à 37°C et on ajoute 12,5 ml de vWF humain [American Bioproducts, Parsippany, NJ, USA ; 11 % d'activité von Willebrand mesurée selon les recommandations d'utilisation du PAP-4 (Platelet Aggregation Profiler^R) à l'aide de 20 plaquettes fixées au formaldéhyde (2×10^5 plaquettes/ml), de plasma humain contenant de 0 à 100 % de vWF et de ristocétine (10 mg/ml, cf. p. 36-45: vW ProgramTM] que l'on incube à 37°C pendant 1 min avant d'ajouter 12,5 ml de la solution de botrocétine [purifiée à partir de venin lyophilisé de Bothrops jararaca (Sigma), selon le protocole décrit par Sugimoto et al., Biochemistry (1991) 266: 25 18172]. L'enregistrement de la lecture de la transmission en fonction du temps est alors réalisée pendant 2 min sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté (Wellcome Distriwell) placé dans la cuve et sous une agitation magnétique de 1100 tr/min assurée par l'agrégamètre. La variation moyenne de la transmission optique (n^3

pour chaque dilution) au cours du temps est donc une mesure de l'agglutination plaquettaire due à la présence de vWF et de botrocétine, en l'absence ou en présence de concentrations variables du produit à tester. A partir de tels enregistrements, on détermine alors le % d'inhibition de l'agglutination plaquettaire due à chaque 5 concentration de produit et on trace la droite donnant le % d'inhibition en fonction de l'inverse de la dilution de produit en échelle log-log. La CI50 (ou concentration de produit provoquant 50 % d'inhibition de l'agglutination) est alors déterminée sur cette droite. Le Tableau de la Figure 9 compare les CI50 de quelques unes des chimères SAH-vWF de la présente invention et démontre que certaines d'entre elles 10 sont de meilleurs antagonistes de l'agglutination plaquettaire que le produit RG12986 décrit par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66] et inclus dans les essais à titre de valeur étalon. Des tests identiques de l'inhibition de l'agglutination de plaquettes humaines en présence de vWF de plasma de porc (Sigma) permet en plus de démontrer que certains des hybrides de la présente invention, et notamment 15 certains variants de type IIB, sont de très bons antagonistes de l'agglutination plaquettaire en l'absence de co-facteurs de type botrocétine. L'antagonisme botrocétine-indépendant de ces chimères particulières peut également être démontré selon le protocole initialement décrit par Ware et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 2946] par déplacement de l'anticorps monoclonal ¹²⁵I-LJ-IB1 (10 mg/ml), un inhibiteur compétitif de la fixation du vWF sur la GPIb plaquettaire [Handa M. et al., (1986) J. Biol. Chem. 261: 12579] après 30 min d'incubation à 22°C en présence 20 de plaquettes fraîches (10^8 plaquettes/ml).

LISTE DE SEQUENCES

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 2591 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 26..2587

REVENDICATIONS

1. Polypeptide recombinant composé d'une partie adhésive dérivée de la structure du vWF capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, et d'une partie permettant sa stabilisation et sa présentation in vivo.
5
2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisée en ce que la partie adhésive est constituée par tout ou partie de la séquence peptidique comprise entre les résidus 445 et 733 du vWF ou d'un variant de celle-ci.
3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que la partie
10 adhésive présente une structure choisie parmi :
 - (a) la séquence peptidique comprise entre les résidus 445-733 du vWF, ou,
 - (b) une partie de la séquence peptidique (a) capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
 - (c) une structure dérivée des structures (a) ou (b) par modifications
15 structurales (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
 - (d) une séquence peptidique non naturelle, par exemple isolée à partir de banques peptidiques aléatoires, et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium.
20
4. Polypeptide selon la revendication 3 caractérisé en ce que la partie adhésive est constituée par une séquence choisie parmi les peptides de type P1, P2, X, XD et X* ou par toute combinaison de ces peptides entre-eux.
5. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce que la partie
25 combinaison des peptides est choisie parmi les peptides de type P1-P2, P1-X, P1-XD, P1-X*, X-P2, XD-P2, X*-P2, P1-X-P2, P1-XD-P2 et P1-X*-P2.
6. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce que la partie adhésive est constituée par tout peptide d'un type défini dans les revendications 4 et
5 représenté plus d'une fois.

7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la partie adhésive est couplée à l'extrémité N-terminale de la structure stabilisatrice.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la partie adhésive est couplée à l'extrémité C-terminale de la structure stabilisatrice.

5 9. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est un polypeptide possédant une demi-vie plasmatique élevée.

10 10. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que le polypeptide possédant une demi-vie plasmatique élevée est une protéine telle qu'une albumine, une apolipoprotéine, une immunoglobuline ou encore une transféline.

15 11. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que le polypeptide possédant une demi-vie plasmatique élevée est dérivé par modification(s) structurale(s) (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus, modification chimique) d'une protéine selon la revendication 10.

12. Polypeptide selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est un polypeptide faiblement ou non-immunogénique pour l'organisme dans lequel il est utilisé.

20 13. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est une albumine ou un variant de l'albumine.

14. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

25 15. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence "leader" permettant la sécrétion du polypeptide exprimé.

16. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 ou 15 sous le contrôle d'une région d'initiation de la transcription et éventuellement d'une région de terminaison de la transcription.

17. Plasmide autoréplicatif comportant une cassette d'expression selon la revendication 16.
18. Cellule recombinante eucaryote ou procaryote dans laquelle a été inséré une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 ou 15 ou une cassette d'expression selon la revendication 16 ou un plasmide selon la revendication 17.
19. Cellule recombinante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure, d'une cellule animale, d'un champignon ou d'une bactérie.
20. Cellule recombinante selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.
- 10 21. Cellule recombinante selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces.
- 15 22. Procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon l'une des revendications 18 à 21 dans des conditions d'expression, et on récupère le polypeptide produit.
23. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

SEQ. ID NO. 1

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	-12
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His	9
CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln	29
TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe	49
GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu	69
TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp	89
TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC Cys Cys Ala Lys Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	109
CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp	129
AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe	149
TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	169
CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly	189
AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg	209
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala	229
GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	249

Figure 1 (a)

CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp 269

TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys 289

ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe 309

GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG
Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met 329

TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG AGA CTT
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu 349

GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GGC GCA GAT CCT CAT GAA TGC
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Asp Pro His Glu Cys 369

TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys 389

CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT
Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val 409

CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC
Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn 429

CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala 449

GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTC AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTC
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val 469

AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA
Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser 489

GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe 509

CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu 529

GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp 549

GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC
Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala 569

MstII

GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA ACC TGT GAA GCC
Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala
SAH<--I-->VWF 589

TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG GTG CCT CCC ACA GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT
 Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr 609

CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC GAT TTC ^{PstI} TAC TGC AGC AGG CTA CTG
Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu 629

GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GGC TCC TCC AGG CTG TCC GAG GCT GAG TTT GAA GTG CTG
 Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu 649

AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CGG CTG CGC ATC TCC CAG AAG TGG GTC CGC GTG
 Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val 669

GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC GGC TCC CAC TAC ATC GGG CTC AAG GAC CGG AAG CGA
 Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg 689

CCG TCA GAG CTG CGG CGC ATT GCC AGC CAG GTG AAG TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC
 Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser 709

ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC TTC AGC AAG ATC GAC CGC CCT GAA
 Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu 729

GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG GAG CCC CAA CGG ATG TCC CGG AAC
 Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn 749

TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC CTG AAG AAG AAG GTC ATT GTG ATC CCG GTG GGC ATT
 Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile 769

GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG CAG ATC CGC CTC ATC GAG AAG CAG GCC CCT GAG AAC AAG
 Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys 789

GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG CAA AGG GAC GAG ATC GTT AGC TAC
 Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr 809

CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT CTG CCC CCC GAC ATG GCA CAA GTC
Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val 829

TAA GCTT

Figure 1 (c)

Figure 2A

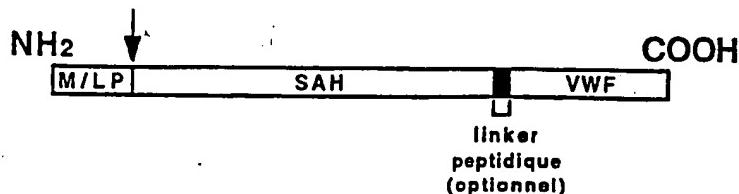


Figure 2B

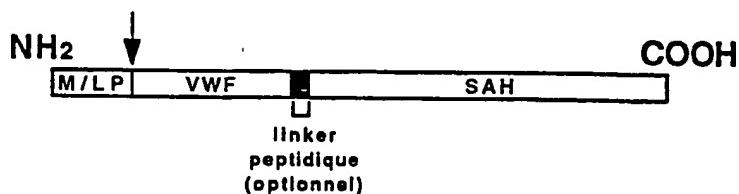


Figure 2C

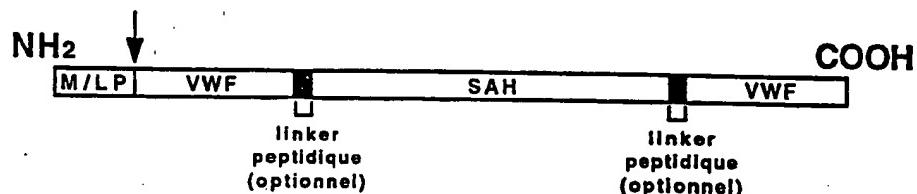


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

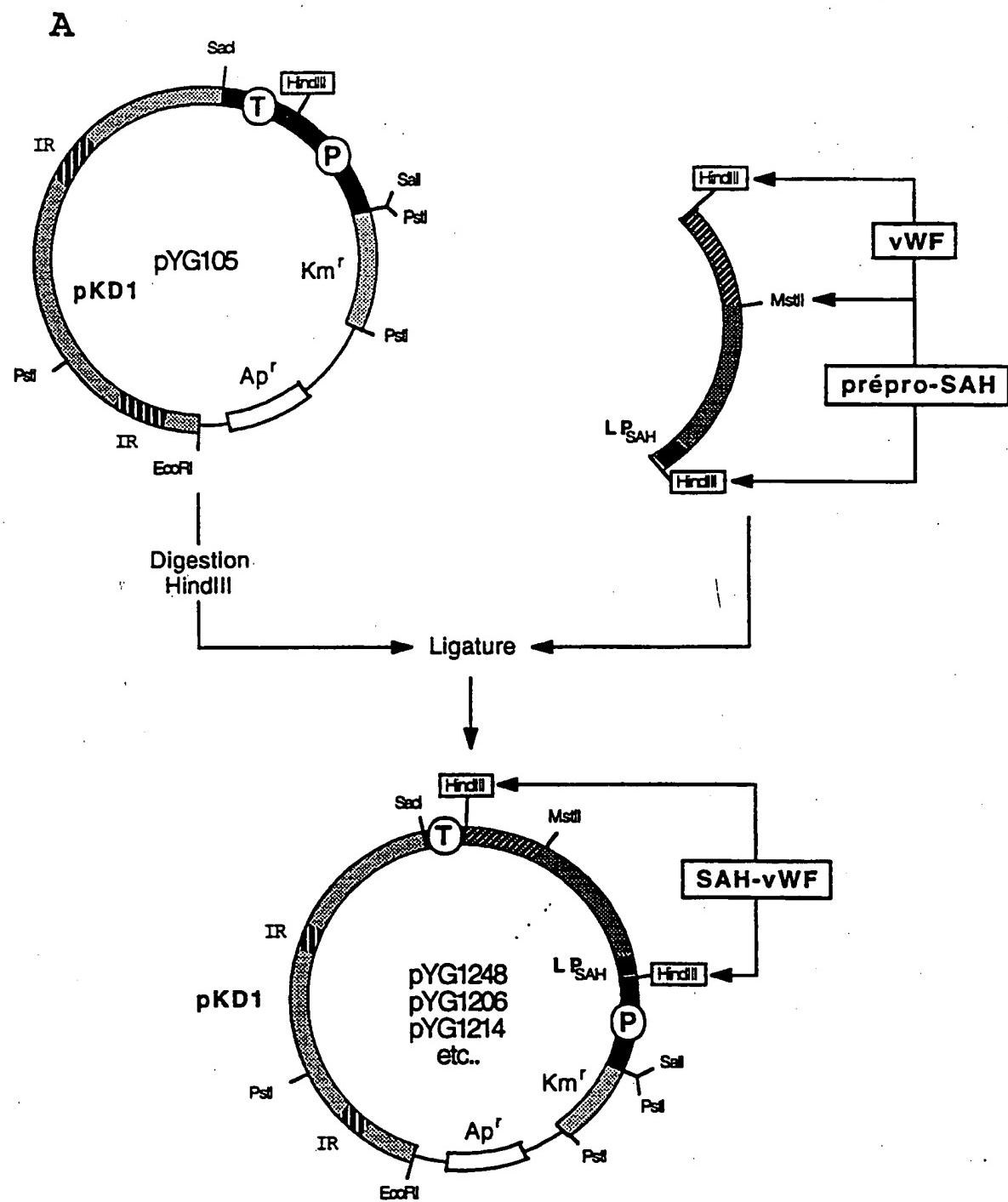


Figure 3 (a)

B

PLASMIDE HSA-vWF	STRATEGIE D'OBTENTION	CARACTERISTIQUES	O-GLYCOSYLATION POTENTIELLE	PLASMIDE D'EXPRESSION
pYG1220	PCR sur pET-8c52K (Sq1969+Sq2029)	vWF470->713	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1248
pYG1310	PCR sur pSE (Sq2149+Sq2622)	vWF470->704 C471G; C474G	T485; T492; T493; S500	pYG1313
pYG1373	PCR sur pET-8c52K (Sq3037+Sq2622)	vWF494->704	S500	pYG1375
pYG1309	PCR sur pET-8c52K (Sq2621+Sq2622)	vWF508->704	NONE	pYG1311
pYG1350	substitution du fragment MstII-PstI de pYG1309 par Sq2751+Sq2752	vWF502->704	NONE	pYG1355
pYG1210	PCR sur pET-8c52K (Sq1969+Sq1970)	vWF470->498	T485; T492; T493;	pYG1214
pYG1204	insertion du fragment MstII-BglII au site MstII de la SAH	vWF694->708	T705	pYG1206
pYG1217	PCR sur pMMB9 (Sq1969+Sq2029)	vWF470->713 Δ509-662	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1223
pYG1269	PCR sur p7E (Sq2149+Sq2029)	vWF470->713 C471G; C474G; C509G; C695G	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1279
pYG1271	PCR sur p5E (Sq2149+Sq2029)	vWF470->713 C471G; C474G	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1283
pYG1359	mutagénèse par Sq2851	vWF470->704 C471G; C474G; R543W	T485; T492; T493; S500	pYG1361
pYG1360	mutagénèse par Sq2855	vWF470->704 C471G; C474G; P574L	T485; T492; T493; S500	pYG1365
pYG1374	substitution du fragment EcoRV-MluI de pYG1359 par Sq3017+Sq3018	vWF470->704 C471G; C474G; R543W; W550C	T485; T492; T493; S500	pYG1377
pYG1386	substitution du fragment SalI-EcoRV de pYG1374 par Sq3019+Sq3020	vWF470->704 C471G; C474G; W550C	T485; T492; T493; S500	pYG1389
pYG1276	PCR sur pET-8c52K (Sq2258+Sq2259)	vWF509->695	NONE	pYG1277

Figure 3 (b)

7/12

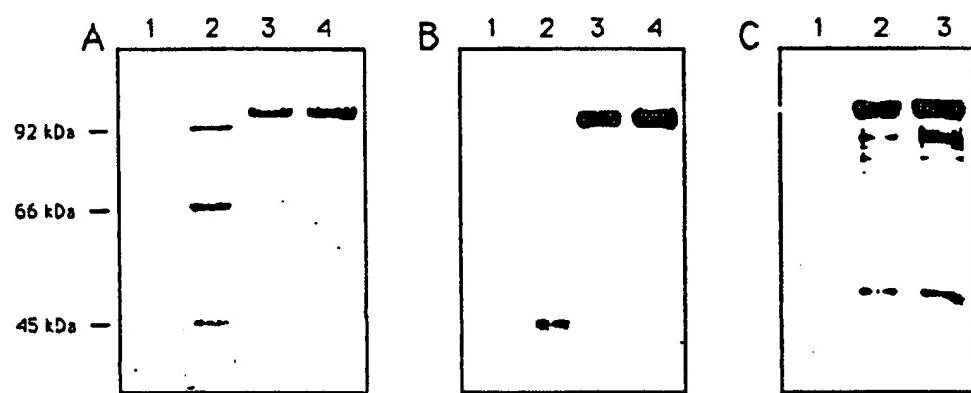


Figure 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

8/12

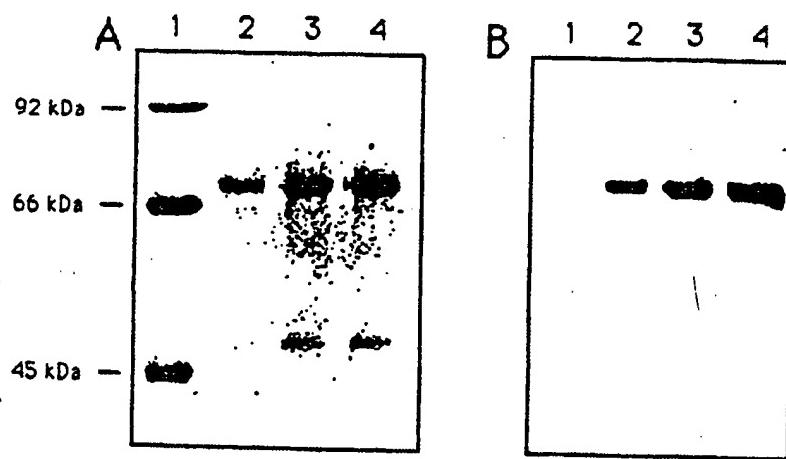


Figure 5

FEUILLE DE REMplacement

9/12

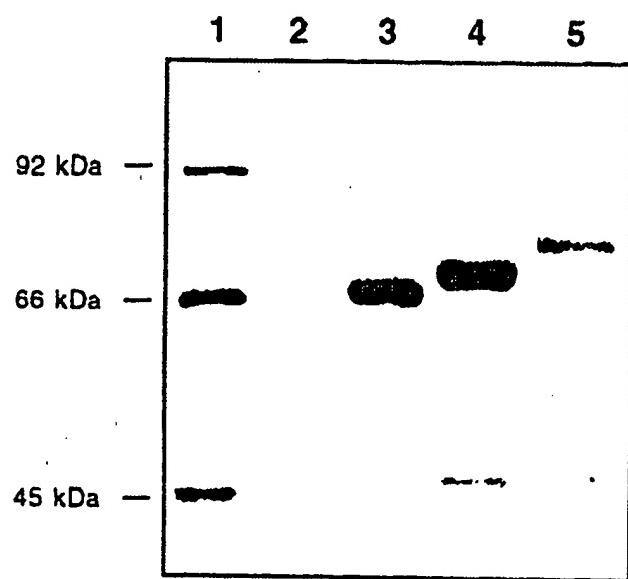


Figure 6

FEUILLE DE REMplacement

10/12

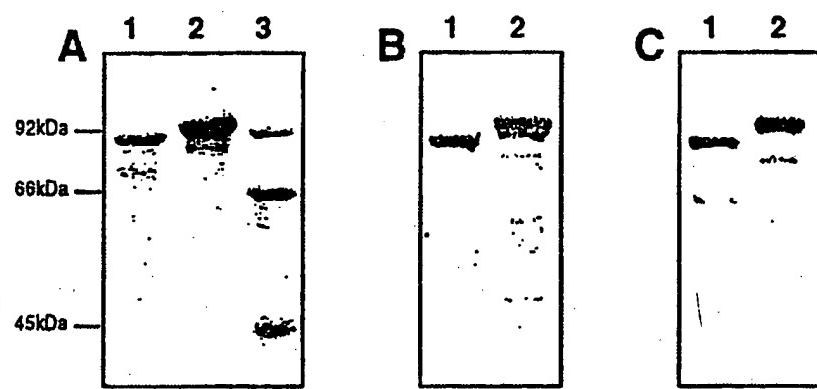


Figure 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT

11/12

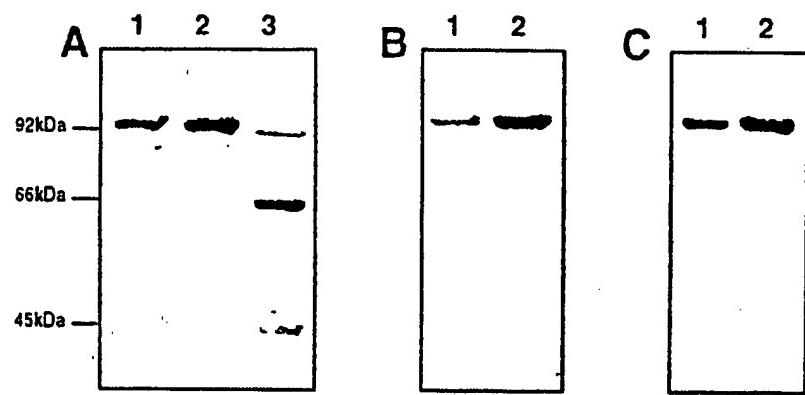


Figure 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT

12/12

PRODUIT	Cl ₅₀ (nM)
RG12986	50
SAH-vWF ₆₉₄₋₇₀₈	50000
SAH-vWF _{C471,474->G} ⁴⁷⁰⁻⁷¹³	20
SAH-vWF _{C471,474->G} ⁴⁷⁰⁻⁷⁰⁴	<10

Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. cl. 5 : C12N 15/12; C12N 15/62; C12N 15/14; C12N 5/10 A61K 37/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl. 5 : C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0 255 206 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 3 February 1988, cited in the application see the whole document	1-23
Y	WO, A, 9 113 093 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORPORATION) 5 September 1991, see the whole document	1-23
Y	EP, A, 0 413 62 (RHONO-POULENC SANTE) 20 February 1991, cited in the application see the whole document	1-23
P,Y	WO, A, 9 300 357 (RHONE POULENC RORER INT HOLDING) 7 January 1993, see the whole document	1-23
P,Y	WO, A, 9 217 192 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 15 October 1992, see the whole document	1-23
P,Y	WO, A, 9 206 999 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 30 April 1992, see the whole document	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 June 1993 (16.06.93)	Date of mailing of the international search report 2 July 1993 (02.07.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<p>International application No. PCT/FR93/00087</p>

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY . (MICROFILMS) Vol. 263, NO.34, 5 December 1988, BALTIMORE, MD US pages 17901-17904 MOHRI, H. ET AL. 'Structure of the von Willebrand Factor domain interacting with glycoprotein Ib' cited in the application see the whole document ---	1-23
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. Vol. 164, No.3, 15 November 1989, DULUTH, MINNESOTA US pages 1339-1347 PIETU, G. ET AL. 'Production in Escherichia coli of a biologically active subfragment of von Willebrand Factor corresponding to the platelet glycoprotein Ib, collagen and heparin binding domains' see the whole document -----	1-23

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300087
SA 70241

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 16/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0255206	03-02-88	AU-B-	617981	12-12-91
		AU-A-	7371587	03-12-87
		JP-A-	63152396	24-06-88
WO-A-9113093	05-09-91	AU-A-	7496491	18-09-91
		EP-A-	0517826	16-12-92
EP-A-0413622	20-02-91	FR-A-	2650598	08-02-91
		CA-A-	2022539	04-02-91
		JP-A-	3178998	02-08-91
WO-A-9300357	07-01-93	AU-A-	2297792	25-01-93
WO-A-9217192	15-10-92	AU-A-	1757592	02-11-92
		AU-A-	9069591	20-05-92
		WO-A-	9206999	30-04-92
WO-A-9206999	30-04-92	AU-A-	9069591	20-05-92
		AU-A-	1757592	02-11-92
		WO-A-	9217192	15-10-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00087

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ?

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/12;
A61K37/02

C12N15/62;

C12N15/14;

C12N5/10

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹¹ des passages pertinents ¹²	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP,A,0 255 206 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 3 Février 1988 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
Y	WO,A,9 113 093 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORPORATION) 5 Septembre 1991 voir le document en entier ---	1-23
Y	EP,A,0 413 622 (RHONO-POULENC SANTE) 20 Février 1991 cité dans la demande voir le document en entier ----	1-23
		-/-

⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant poser un doute sur une révendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 JUIN 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02 -07- 1993

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

CHAMBONNET F.J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,Y	WO,A,9 300 357 (RHONE POULENC RORER INT HOLDING) 7 Janvier 1993 voir le document en entier ---	1-23
P,Y	WO,A,9 217 192 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 15 Octobre 1992 voir le document en entier ---	1-23
P,Y	WO,A,9 206 999 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 30 Avril 1992 voir le document en entier ---	1-23
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS) vol. 263, no. 34, 5 Décembre 1988, BALTIMORE, MD US pages 17901 - 17904 MOHRI, H. ET AL. 'Structure of the von Willebrand Factor domain interacting with glycoprotein Ib' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 164, no. 3, 15 Novembre 1989, DULUTH, MINNESOTA US pages 1339 - 1347 PIETU, G. ET AL. 'Production in Escherichia coli of a biologically active subfragment of von Willebrand Factor corresponding to the platelet glycoprotein Ib, collagen and heparin binding domains' voir le document en entier -----	1-23

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300087
SA 70241

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

16/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0255206	03-02-88	AU-B- 617981 AU-A- 7371587 JP-A- 63152396	12-12-91 03-12-87 24-06-88
WO-A-9113093	05-09-91	AU-A- 7496491 EP-A- 0517826	18-09-91 16-12-92
EP-A-0413622	20-02-91	FR-A- 2650598 CA-A- 2022539 JP-A- 3178998	08-02-91 04-02-91 02-08-91
WO-A-9300357	07-01-93	AU-A- 2297792	25-01-93
WO-A-9217192	15-10-92	AU-A- 1757592 AU-A- 9069591 WO-A- 9206999	02-11-92 20-05-92 30-04-92
WO-A-9206999	30-04-92	AU-A- 9069591 AU-A- 1757592 WO-A- 9217192	20-05-92 02-11-92 15-10-92

International Publication No. WO 93/15200 A1

Job No.: 1074-85207

**Translated from French by the Ralph McElroy Translation Co.
910 West Avenue, Austin, Texas, 78701**

Ref.: 06832.0004-02000

INTERNATIONAL PATENT OFFICE
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 93/15200 A1¹

International Patent Classification ⁵ :	C 12 N	15/12
		15/62
		15/14
	C 12 N	5/10
	A 61 K	37/02

International Filing No.: PCT/FR93/00087

International Filing Date: January 28, 1993

International Publication Date: August 5, 1993

Priority

Date: January 31, 1992

Country: FR

No.: 92/01066

Designated States: CA, FI, JP, NO, US, European
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE)

ANTITHROMBOTIC POLYPEPTIDES AS ANTAGONISTS OF THE BINDING OF vWF TO
PLATELETS OR TO SUBENDOTHELIUM

¹ [p. 29 of the patent document and pp. 1-4,7-11 of the figures are replacement sheets]

Inventors and**Inventors/Applicants (only for US):**

Reinhard Fleer [DE/FR]
47, avenue Beauséjour
F-91440 Bures-sur-Yvette (FR)

Alain Fournier [FR/FR]
28, avenue Roger-Salengro
F-92000 Châtenay-Malabry (FR)

Jean-Dominique Guitton [FR/FR]
74, rue Dunois
F-75013 Paris (FR)

Gérard Jung [FR/FR]
12, rue des Grands-Jarins
Leuville-sur-Orge
F-91310 Monthéry (FR)

Patrice Yeh [FR/FR]
11 bis, rue Lacépède
F-75005 Paris (FR)

**Applicant (for all designated
states other than US):**

Rhone-Poulenc Rorer S.A. [FR/FR]
20, avenue Raymond-Aron
F-92160 Antony (FR)

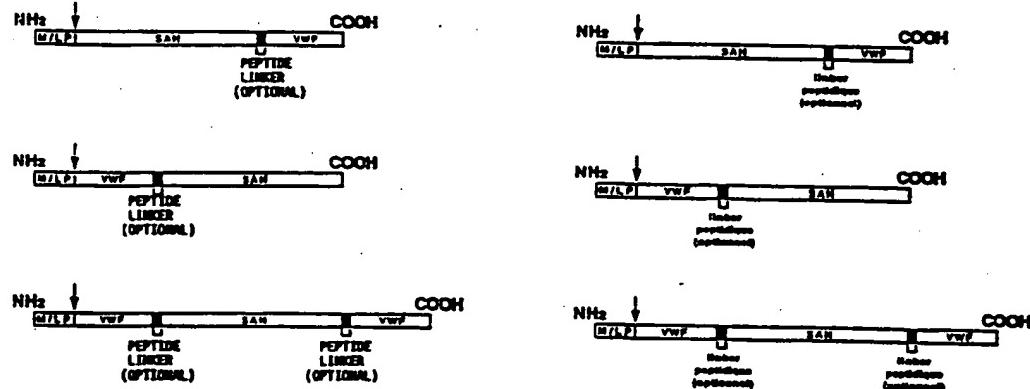
Agent:

Philippe Becker
Rhône-Poulenc Rorer S.A.
Patent Department
20, avenue Raymond-Aron
F-92165 Antony Cedex (FR)

Published

With International Search Report.

Before expiration of the period permitted for modification of the claims, will be republished if modifications are received.



(57) Abstract

Recombinant polypeptides consisting of an adhesive portion derived from the structure of the vWF which is at least partially antagonistic to the bond between said vWF and the platelets and/or the subendothelium, as well as a portion for stabilising and presenting it *in vivo*; preparation thereof; and pharmaceutical compositions containing said polypeptides.

FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AT	Austria	ML	Mali
AU	Australia	MN	Mongolia
BB	Barbados	MR	Mauritania
BE	Belgium	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	NO	Norway
BJ	Benin	NZ	New Zealand
BR	Brazil	PL	Poland
CA	Canada	PT	Portugal
CF	Central African Republic	RO	Romania
CG	Congo	RU	Russian Federation
CH	Switzerland	SD	Sudan
CI	Côte d'Ivoire	SE	Sweden
CM	Cameroon	SK	Slovak Republic
CS	Czechoslovakia	SN	Senegal
CZ	Czech Republic	SU	Soviet Union
DE	Germany	TD	Chad
DK	Denmark	TG	Togo
ES	Spain	UA	Ukraine
FI	Finland	US	United States of America
FR	France	VN	Vietnam
GA	Gabon		
GB	United Kingdom		
GN	Guinea		
GR	Greece		
HU	Hungary		
IE	Ireland		
IT	Italy		
JP	Japan		
KP	Democratic People's Republic of Korea		
KR	Republic of Korea		
KZ	Kazakhstan		
LI	Liechtenstein		
LK	Sri Lanka		
LU	Luxembourg		
MC	Monaco		
MG	Madagascar		

The present invention concerns novel antithrombotic polypeptides, their preparation and pharmaceutical compositions containing them. More specifically, the present invention concerns novel polypeptides comprising a part derived from the structure of the von Willebrand's factor (vWF) which is intrinsically capable of binding to blood platelets and/or the subendothelium.

vWF is a glycosylated protein comprising 2813 amino acids which contains a 22 residue signal sequence, a 741 residue "pro" region and a 2050 amino acid mature protein organized into several repeated structures (Titani, K. et al., Biochemistry 25 (1986) 3171-3184; Verweij, C. L. et al., EMBO J. 5 (1986), 1839-1847). This complex glycoprotein is present in vivo, or it is stored in specialized vesicles of the endothelial cells or of the platelets, or in a circulating form in the blood plasma after secretion and proteolytic maturation during the secretion process. The circulating forms of vWF are present in the form of high molecular weight multimers (up to 20,000 kd), and whose protomer is a dimer of approximately 450 kd. The vWF gene was cloned and sequenced by several teams and mapped on the short arm of the chromosome 12 (Sadler, J. E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij, C. L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171; Bonthron D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127; Ginsburg, D. et al., Science 228 (1985) 1401-1406).

vWF is involved in the genesis of arterial thrombi by a complex interaction which is poorly understood between certain components of the subendothelium on the one hand and the blood platelets on the other hand (and notably the platelet GP1b receptors). An important point is that circulating plasma vWF does not spontaneously bind to the GP1b receptors of the platelets, and it is likely that its interaction with the subendothelium is necessary to unmask its interaction site(s) with the platelets, for example, after a conformational change of the vWF. The interaction between the vWF these activated and the platelet GP1b leads to the activation of the blood platelets, which then acquire the capacity to aggregate and to generate a fibrinocellular thrombus in the presence of certain adhesive proteins (fibrinogen, thrombospondin, vWF, etc.).

Taking into account its early role in platelet activation, vWF constitutes a pharmacological target of choice for the preparation of antithrombotic agents. However, numerous difficulties have to be overcome to be able to exploit this molecule on the pharmacological level: the incapacity of the circulating vWF to bind the platelets, the lack of knowledge on the respective contribution of the different adhesive functions of vWF (subendothelium and platelets) in its thrombogenic activity, the difficulty of producing sufficiently large amounts of sufficiently pure and homogeneous products for use as therapeutic agents, the large size of vWF and its complexity, the dynamics of its tertiary structure, etc. Some fragments of vWF have been obtained by proteolytic digestion and studied on the pharmacological level. Recombinant fragments have also been produced (EP 255 206; Sugimoto, M. et al., Biochemistry 30 (1991) 5202-5209; Azuma, H. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991)

12342-12347). It is apparent from these studies that the molecules obtained are not entirely satisfactory, and in particular that they do not behave as optimal antagonists of the vWF-platelet interaction in the absence of certain nonphysiological ligands (such as, for example, ristocentin or botrocetin), or they have to be chemically modified (for example, reduction and alkylation), probably to unmask the cryptic binding sites of vWF to platelet GP1b.

The present invention provides novel molecules which are intrinsically capable of at least partially antagonizing platelet activation. The molecules of the invention comprise an adhesive part which is derived from the structure of vWF and a part which allows its functional presentation and ensures the stability and the distribution of the molecule in vivo. Indeed, the applicant has shown that it is possible to genetically couple vWF with a structure of the protein type and to produce such molecules at satisfactory levels. In addition, the molecules of the invention allow the generation and the use of small structures derived from vWF, and which are thus very specific for a desired effect (for example, antagonists of the vWF-GP1b interaction alone). Moreover, the applicant has shown that such a coupling promotes the presentation of this structure at its binding site(s). The polypeptides of the invention thus make it possible to expose, within a stable structure, structures derived from vWF which are capable of at least partially antagonizing the bond of vWF to the platelets, and as a result, of inhibiting platelet activation. The polypeptides of the invention also make it possible to expose, within a stable structure, structures derived from vWF which are capable of at least partially antagonizing the bond of vWF to the subendothelium.

A subject of the present invention therefore concerns molecules comprising an adhesive part derived from the structure of vWF, capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to the platelets and/or the subendothelium, and a part of a protein nature allowing its in vivo stabilization and presentation.

More specifically, in the molecules of the invention the adhesive part consists in its entirety or in part of the peptide sequence between the residues 445-733 of vWF or one of its variants. The peptide sequence of vWF having been published, the numbering of the residues of the adhesive part of the molecules of the invention refers to the numbering of the sequence of vWF published by Titani et al. (*Biochemistry* 25 (1986) 3171-3184). It is understood that this function can be redundant within molecules of the present invention. A part of this sequence of vWF (residues Thr470 to Val713) is indicated in Figure 1, in which human serum albumin is coupled at the C-terminal.

In the meaning of the present invention, the term "variant" denotes any molecule obtained by the modification of the sequence which is capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to the platelets and/or the subendothelium. The expression "modification" denotes any mutation, substitution, deletion, addition or modification obtained, for example, by

the techniques of genetic engineering. Such variants can be generated for different purposes, such as, notably, to increase the affinity of the molecule for its binding site(s), to improve its production levels, to reduce its susceptibility to proteases, to increase its therapeutic efficacy or to reduce its side effects, or to confer novel pharmacokinetic or biological properties to it, notably adhesive functions which are intrinsically expressed in a noncryptic manner.

Particularly advantageous polypeptides of the invention are those in which the adhesive part presents:

- (a) the peptide sequence between the residues 445-733 of vWF, or
- (b) a part of the peptide sequence (a), capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to GPb1 and/or the subendothelium, or
- (c) a structure derived from structures (a) or (b) by structural modifications (mutation, substitution, addition and/or deletion of one or more residues) and capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to GPb1 and/or the subendothelium, or
- (d) a non-natural peptide sequence, for example, one isolated from peptide banks and capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to GP1b and/or the subendothelium.

Among the structures of type (b) one can mention more specifically those that preserved the capacity of antagonizing the interaction between vWF and platelet GP1b, such as, for example, the peptides G10 or D5 described by Mori et al. (*J. Biol. Chem.* **263** (1988) 17901-17904), or the peptides which preserved their capacity to bind to collagen (Pareti, F. I. et al., *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 15310-15315; Roth, G. J. et al., *Biochemistry* **25** (1986) 8357-8361), and/or heparin (Fujimura, Y. et al., *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 1734-1739), and/or botrocetin (Sugimoto, M. et al., *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 18172-18178), and/or the sulfatides (Christophe, O. et al., *Blood* **78** (1991) 2310-2317), and/or ristocentin, etc..., or any combination between these different adhesive structures.

The structures of type (c) comprise, for example, the molecules in which certain N- or O-glycosylation sites were modified or suppressed, as well as the molecules in which one or more or all the cysteine residues were substituted, or point and/or multiple mutants concerning at least one residue involved in pathologies of type IIB associated with the vWF, such as the Arg543, Arg545, Trp550, Val553 or Arg578 residues, for example. They also comprise molecules obtained from (a) or (b) by deletion of regions that do not intervene or intervene little in the interaction with the binding sites considered, and molecules comprising, compared to (a) or (b), additional residues such as, for example, an N-terminal methionine and/or a secretion signal sequence and/or a polypeptide adapter allowing the joining to the stabilizing structure.

As an example, one can cite polypeptides of the invention comprising the stabilizing structure coupled:

- to a peptide of type P1, whose minimum version corresponds to the peptide G10 between the Cys474 and Pro488 residues of vWF, or
- to a peptide of type P2 whose minimal version corresponds to the peptide D5 between the Leu694 and Pro708 residues of vWF, or
 - to a peptide of type X or XD corresponding, respectively, to the fragment of vWF between the Pro488 and Leu694 residues, and its variants obtained by deletion, or
 - to a peptide of type X* defined as any molecular variant of the peptides of type X and XD, or
 - to any combination of these peptides, and, among others:
 - the peptides of type P1-P2;
 - the peptides of type P1-X, P1-XD, P1-X*;
 - the peptides of type X-P2, XD-P2, X*-P2;
 - the peptides of type P1-X-P2;
 - the peptides of type P1-XD-P2;
 - the peptides of type P1-X*-P2;
 - any adhesive peptide as defined above and represented more than once within the molecule of the invention.

The adhesive part of the molecules of the invention can be coupled, directly, or through the intermediary of a joining peptide to the stabilizing protein structure. In addition, it can form the N-terminal end or the C-terminal end of the molecule. It is preferred in the molecules of the invention for the adhesive part to constitute the C-terminal part of the chimera.

It is preferred for the stabilizing structure of the polypeptides of the invention to be a polypeptide having a high plasma half-life. For example, it can be a protein such as an albumin, an apolipoprotein, an immunoglobulin or a transferrin, etc... It can also consist of peptides derived from such proteins by structural modifications, or artificially or semiartificially synthesized peptides having a high plasma half-life. Moreover, the stabilizing structure used is given preference over a weakly immunogenic or nonimmunogenic polypeptide for the organism in which the polypeptide of the invention is used.

In a particularly advantageous embodiment of the invention, the stabilizing structure is an albumin or a variant of albumin, for example human serum albumin (HSA). It is understood that the variations of the albumin denote any protein with high plasma half-life obtained by modification (mutation, deletion and/or addition) by the techniques of genetic engineering of a gene coding for a given isomorph of human serum albumin, as well as any macromolecule with high plasma half-life obtained by in vitro modification of the protein coded for by such genes. Since albumin is very polymorphous, numerous natural variants have been identified and listed (Weitkamp, L. R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219). For example, the chimeras between

said adhesive function(s) and mature HSA possess pharmaceutical properties and antithrombotic activities which are particularly useful in therapy.

Another subject of the invention concerns a method for the preparation of the above-described chimeric molecules. More specifically, this method consists in having a eukaryotic or prokaryotic cell host express a nucleotide sequence coding for the desired polypeptide, and then in harvesting the polypeptide produced.

Among the eukaryotic hosts that can be used in the context of the present invention, one can mention animal cells, yeasts or fungi. In particular, in the case of yeasts, one can mention the yeasts of the genera *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, or *Hansenula*. In the case of animal cells, one can mention the COS, CHO, C127 cells, etc... Among the fungi that can be used in the present invention, one can cite, more specifically, *Aspergillus* ssp. [sic; spp.] or *Trichoderma* ssp. As prokaryotic hosts, it is preferred to use the bacteria such as *Escherichia coli*, or those belonging to the genera *Corynebacterium*, *Bacillus* or *Streptomyces*.

The nucleotide sequences that can be used in the context of the present invention can be prepared in different manners. In general, they are obtained by assembling in a reading frame the sequences which code for each one of the functional parts of the polypeptide. The latter can be isolated by the techniques known to a person skilled in the art, for example directly from cellular messenger RNA (mRNA), or by recloning from a complementary DNA bank (cDNA) prepared from producing cells, or they can be completely synthetic nucleotide sequences. Moreover, it is understood that the nucleotide sequences can also be modified later, for example by the techniques of genetic engineering, in order to obtain derivatives or variants of said sequences.

More advantageously, in the process of the invention, the nucleotide sequence is a part of an expression cassette comprising a transcription initiation region (promoter region) which allows, in the host cells, the expression of the nucleotide sequence placed under its control and coding for the polypeptides of the invention. This region can originate from promoter regions of genes that are strongly expressed in the host cell used, the expression being constitutive or regulable. In the case of yeasts, the promoter can be the promoter of phosphoglycerate kinase (PGK), of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) gene, of lactase (LAC4), of the enolases (ENO), of the alcohol dehydrogenases (ADH) genes, etc... In the case of bacteria, the promoter can be the right or left promoter of the genes of bacteriophage lambda (P_L , P_R), or promoters of the genes of the tryptophan (P_{trp}) or lactose (P_{lac}) operons. In addition, this control region can be modified, for example by in vitro mutagenesis, by the introduction of additional control elements or synthetic sequences, or by deletions or substitutions of the original control elements. The expression cassette can also comprise a region of termination of the functional transcription in the host considered, positioned immediately downstream of the nucleotide sequence coding for a polypeptide of the invention.

In a preferred method, the polypeptides of the invention result from the expression of a eukaryotic or prokaryotic host of a nucleotide sequence and the secretion of the expression product of said sequence in the culture medium. Indeed, it is particularly advantageous to be able to obtain, by a recombinant route, the molecules directly in the culture medium. In this case, the nucleotide sequence coding for a polypeptide of the invention is preceded by a "leader" sequence (or signal sequence) directing the nascent polypeptide into the secretory routes of the host used. This "leader" sequence can be the natural signal sequence of vWF or the stabilizing structure in the case where it is a naturally secreted protein, but it can also be any other functional "leader" sequence, or an artificial "leader" sequence. The choice of either one of these sequences is notably dependent on the host used. Examples of functional signal sequences include those of the genes of sexual pheromones or of the "killer" toxins of yeasts.

In addition to the expression cassette, one or more markers which allow the selection of the recombinant host can be added, such as for example the URA3 gene of *S. cerevisiae*, or genes which confer resistance to antibiotics such as geneticin (G418), or any other toxic compound, such as certain metal ions.

The assembly constituted the expression cassette and the selection marker can be introduced either directly into the host cells considered, or they can be first inserted into a functional self-replicating vector. In the first case, the sequences which are homologous to regions present in the genome of the host cells are preferably added to this assembly; said sequences being then positioned on each side of the expression cassette and of the selection gene so as to increase the frequency of integration of the assembly into the genome of the host by targeting the integration of the sequences by homologous recombination. In the case where the expression cassette is inserted in a replicating system, a preferred replication system for yeasts of the genus *Kluyveromyces* is derived from the plasmid pKD1, which was initially isolated from *K. drosophilarum*; a preferred replication system for yeasts of the genus *Saccharomyces* is derived from the plasmid 2 μ of *S. cerevisiae*. In addition, this expression plasmid can contain all or part of said replication systems, or it can combine elements derived from the pKD1 plasmid as well as from the plasmid 2 μ .

In addition, the expression plasmids can be shuttle vectors between a bacterial host such as *Escherichia coli* and the chosen host cell. In this case, a replication origin and a selection marker which function in the bacterial host are required. It is also possible to position restriction sites surrounding the bacterial and unique sequences on the expression vector: this allows the elimination of these sequences by cutting and religation *in vitro* of the truncated vector before transformation of the host cells, which can result in an increase in the number of copies and in an increased stability of the expression plasmids in said hosts. For example, such restriction sites can correspond to sequences such as 5'-GGCCNNNNNGGC-3' (SfiI) or 5'-GC GGCCGC-3'

(NotI) to the extent that the sites are extremely rare and generally absent from an expression vector.

After the construction of such vectors or expression cassettes, the latter are introduced into the chosen host cells using classic techniques described in the literature. In this regard, any method which allows the introduction of a foreign DNA into a cell can be used. They can notably be transformation, electroporation, conjugation, or any other technique known to a person skilled in the art. As an example of hosts of the yeast type, the different strains of *Kluyveromyces* used were transformed by treating the whole cells in the presence of lithium acetate and polyethylene glycol according to the technique described by Ito et al. (*J. Bacteriol.* 153 (1983) 163). The transformation technique described by Durrens et al. (*Curr. Genet.* 18 (1990) 7), using glycol and dimethyl sulfoxide was also used. It is also possible to transform the yeasts by electroporation according to the method described by Karube et al. (*FEBS Letters* 182 (1985) 90). An alternative protocol is also described in detail in the following examples.

After the selection of the transformed cells, the cells expressing said polypeptides are inoculated, and the recovery of said polypeptides can be done either during cell growth by "continuous" processes, or at the end of growth for "batch" cultures. The polypeptides which are the subject of the present invention are then purified from the culture supernatant for their molecular, pharmacokinetic and antithrombotic characterization.

A preferred expression system of the polypeptides of the invention consists of the use of yeasts of the genus *Kluyveromyces* as the host cell, transformed by certain vectors derived from the extrachromosomal replicon pKD1 initially isolated in *K. marxianus* var. *drosophilicola*. These yeasts, particularly *K. lactis* and *K. fragilis*, are generally capable of replicating said vectors in a stable manner and in addition they have the advantage of being included in the list of G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe") organisms. Yeasts are preferentially industrial strains of the genus *Kluyveromyces* capable of replicating in a stable manner said plasmids derived from the plasmid pKD1, and in which a selection marker was inserted, as well as an expression cassette allowing the secretion of the polypeptides of the invention at high levels.

The present invention also concerns the nucleotide sequences coding for the above-described chimeric polypeptides, as well as the eukaryotic or prokaryotic recombinant cells comprising such sequences.

The present invention also concerns the application as a drug of the polypeptides according to the present invention. More specifically, the subject of the invention is any pharmaceutical composition comprising one or more polypeptides as described above. More specifically, these compositions can be used for the prevention or the treatment of thromboses.

The present invention will be described more completely with the aid of the following examples, which must be considered as illustrative and nonlimiting.

List of the figures

The representations of the plasmids indicated in the following figures are not drawn to scale, and only the restriction sites which are important for understanding the cloning operations carried out are indicated.

Figure 1: Nucleotide sequence of a restriction fragment HindIII coding for a chimeric protein of the type HSA-vWF. The black arrows indicate the end of the "pre" and "pro" regions of the HSA. The MstII and PstI restriction sites are underlined. The numbering of the amino acids (right column) corresponds to the mature chimeric protein HSA-vWF470->713 (829 residues); the fragment Thr470-Val713 of vWF of this particular chimera is numbered from the Thr586 to Val829 residue. The Thr470, Leu494, Asp498, Pro501, Tyr508, Leu694, Pro704 and Pro708 residues of mature vWF are underlined.

Figure 2: Schematic representation of chimeras of the type HSA-vWF (A), of the type vWF-HSA (B) or vWF-HSA-vWF (C). Abbreviations used: M/LP, translation initiator methionine residue, optionally followed by a secretion signal sequence; HSA, mature human serum albumin or one of its variants; vWF, a fragment(s) of vWF possessing the property of binding to platelets and/or the subendothelium, or a variant obtained by the techniques of genetic engineering. The black arrow indicates the N-terminal end of the mature protein.

Figure 3: A, restriction map of the plasmid pYG105 and strategy for the construction of the expression plasmids of the chimeric proteins of the present invention. Abbreviations used: P, transcription promoters; T, transcription terminator; IR, inverted repeated sequences of the plasmid pKD1; LP_{HSA}, "prepro" region of HSA; Ap^r and Km^r denote the genes of resistance to ampicillin (*E. coli*) and G418 (yeasts), respectively.

B, characteristics and genetic relationship of the principal expression plasmids of the hybrids between HSA and vWF exemplified in the present invention. The plasmids of the first column are plasmids of the pUC type comprising a HindIII restriction fragment corresponding to translational fusions between the totality of the HSA and a fragment or a molecular variant of vWF. The expression plasmids correspond to cloning in the productive orientation of these HindIII fragments in the HindIII site of the plasmid pYG105 (LAC4).

Figure 4: Characterization of the material secreted after 4 days of culture (Erlenmeyer flasks) of the strain CBS 293.91 transformed by the plasmids pYG1248 (expression plasmid of a chimera of the type HSA-P1-X-P2) and pKan707 (control plasmid). In this experiment, the results of panels A, B and C had migrated on the same gel (8.5% SDS-PAGE), and then treated separately.

A, staining with Coomassie blue; molecular weight standard (lane 2); supernatant equivalent to 50 µL of the culture transformed by the plasmids pKan707 in YPL medium (lane 1), or pYG1248 inYPD medium (lane 3) or YPL (lane 4).

B, immunological characterization of the material secreted after the use of mouse antibodies directed against human vWF: same legend as for A, except that biotinylated molecular weight standards were used.

C, immunological characterization of the material secreted after the use of rabbit antibodies directed against human albumin; supernatant equivalent to 50 µL of the culture transformed by the plasmids pKan707 in YPL medium (lane 1), or pYG1248 inYPD medium (lane 2) or YPL (lane 3).

Figure 5: Kinetics of secretion of a chimera of the type HSA-P2 by the strain CBS 293.91 transformed by the plasmid pYG1206.

A, staining with Coomassie blue; molecular weight standard (lane 1); supernatant equivalent to 2.5 µL of a "Fed Batch" culture in YPD medium after 24 h (lane 2), 40 h (lane 3) or 46 h (lane 4) of growth.

B, immunological characterization of the material secreted after use of mice antibody directed against human vWF: same legend as for A except that biotinylated molecular weight standards were used.

Figure 6: Characterization of the material secreted by *K. lactis* transformed by the plasmids pKan707 (control plasmid, lane 2), pYG1206 (expression plasmid of a chimera of the type HSA-P2, lane 3), pYG1206 (expression plasmid of a chimera of type HSA-P2, lane 3), pYG1214 (expression plasmid of a chimera of the type HSA-P1, lane 4) and PYG1223 (expression plasmid of a chimera of the type HSA-P1-XD-P2, lane 5); molecular weight standard (lane 1). The deposits correspond to 50 µL of supernatant of a stationary culture after growth in YPD medium, migration in an 8.5% acrylamide gel and staining with Coomassie blue.

Figure 7: Characterization of the material secreted after 4 days of culture (Erlenmeyer flasks) of the strain CBS 293.91 transformed by the plasmids pYG1311 (HSA-vWF508->704) and pYG1313 (HSA-vWF470->704, C471G, C474G), after migration on an 8,5% SDS-PAGE gel.

A, staining with Coomassie blue; supernatant equivalent to 100 µL of the culture transformed by the plasmids pYG1311 (lane 1) or pYG1313 (lane 2) in YPL medium; molecular weight standard (lane 3).

B, immunological characterization of the material secreted after the use of mice antibodies directed against human vWF: same legend as for A.

C, immunological characterization of the material secreted after the use of rabbit antibodies directed against human vWF; same legend as for A.

Figure 8: Characterization of the material secreted after 4 days of culture (Erlenmeyer flasks) of the strain CBS 293.91 transformed by the plasmids pYG1361 (HSA-vWF470->704, C471G, C474G, R543W) and pYG1365 (HSA-vWF470-<704, C471G, C474G, P574L), after migration on an 8.5% SDS-PAGE gel. In this experiment, the results of panels A, B and C had migrated in the same gel, then treated separately.

A, staining with Coomassie blue; supernatant equivalent to 100 µL of the culture transformed by the plasmids pYG1361 (lane 1) or pYG1365 (lane 2) in YPL medium; molecular weight standard (lane 3).

B, immunological characterization of the material secreted after use of mouse antibodies directed against human vWF: same legend as for A.

C, immunological characterization of the material secreted after use of rabbit antibodies directed against ASA; same legend as for A.

Figure 9: In vitro assay of the antagonistic activity for agglutination of human platelets fixed by paraformaldehyde: IC₅₀ of the hybrids HSA-vWF694-708 (HSA-vWF470-713 C471G, C474G) and (HSA-vWF470-704 C471G, C474G) with respect to the standard RG12986. The determination of the dose-dependent inhibition of the platelet agglutination is carried out under stirring at 37°C using a PAP-4 aggregometer, in the presence of human vWF, of botrocetin (8.2 mg/mL) and of the product to be tested at different dilutions. The concentration of the product which allows the inhibition of half of the control agglutination (absence of product) is then determined (IC₅₀)

Examples

General cloning techniques

The methods which are classically used in molecular biology, such as the preparative extractions of plasmid DNA, the centrifugation of plasmid DNA in a cesium chloride gradient, the electrophoresis on agarose or acrylamide gels, the purification of DNA fragments by electroelution, the extractions of proteins with phenol or phenol-chloroform, the precipitation of DNA in a saline medium by ethanol or isopropanol, the transformation in *Escherichia coli*, etc., are well known to a person skilled in the art and they have been extensively described in the literature (Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel, F. M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York, 1987).

The restriction enzymes were supplied by New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) or Amersham, and they are used according to the recommendations of the suppliers.

The plasmids of the type pBR322, pUC and the phages of the M13 series are of commercial origin (Bethesda Research Laboratories).

For the ligations, the DNA fragments are separated by size by electrophoresis on agarose or acrylamide gels, extracted with phenol or with a phenol/chloroform mixture, precipitated with ethanol, and then incubated in the presence of the phage T4 DNA ligase (Biolabs) according to the recommendations of the supplier.

The filling of the projecting 5' ends is carried out by the Klenow fragment of DNA polymerase I of *E. coli* (Biolabs) according to the specifications of the supplier. The destruction of the projecting 3'-ends is carried out in the presence of the phage T4 DNA polymerase (Biolabs), used according to the recommendations of the manufacturer. The destruction of the projecting 5'-ends is carried out by a controlled treatment with S1 nuclease.

The in vitro mutagenesis directed by synthetic oligodeoxynucleotides is carried out according to the method developed by Taylor et al. (*Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 8749-8764), using the kit distributed by Amersham.

The enzymatic amplification of DNA fragments using the PCR technique (Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki, R. K. et al., *Science* 230 (1985) 1350-1354; Mullis, K. B. and Faloona, F. A., *Meth. Enzym.* 155 (1987) 335-350) is carried out using a DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus) according to the specifications of the manufacturer.

The verification of the nucleotide sequences is carried out by the method developed by Sanger et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 5463-5467) using the kit distributed by Amersham.

The numbering of the amino acids of vWF is that of Titani et al. (*Biochemistry* 25 (1986) 3171-3184).

The transformations of *K. lactis* with the DNA of the expression plasmids of proteins of the present invention are carried out by any technique known to a person skilled in the art, an example of which is given in the text.

Unless otherwise indicated, the bacterial strains used are *E. coli* MC1060 (lacIPOZYA, X74, galU, galK, strA') or *E. coli* TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5/FtraD36, proA^rB^r, lacI^q, lacZ, M15).

The yeast strains used belong to the budding yeasts, and more specifically to the yeasts of the genus *Kluyveromyces*. The strain *K. lactis* MW98-8C (a, uraA, arg, lys, K⁺, pKD1°) and *K. lactis* CBS 239.91 were used in particular; a sample of strain MW98-8C was deposited on September 16, 1988 at Central Bureau For Fungal Cultures (CBS) at Baarn (Netherlands) where it is registered under number CBS 579.88.

A bacterial strain (*E. coli*) transformed by the plasmid pET-8c52K was deposited on April 17, 1990 at the American Type Culture Collection under the number ATCC 68306.

The yeast strains transformed by the expression plasmids coding for the proteins of the present invention are cultured in Erlenmeyer flasks or in 2 L pilot fermenters (SETRIC, France) at 28°C in a rich medium (YPD: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose; or YPL: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% lactose) under constant stirring.

Example 1: Construction of the plasmid pET-8c52K and of its molecular variants

The cDNA fragment of vWF coding for residues 445-733 of human vWF has several determinants which are crucial for the interaction between vWF and the platelets on the one hand and certain elements of the basal membrane and of the subendothelium tissue on the other hand. The amplification of these genetic determinants can be carried out, for example, from a human cell line expressing vWF, and, for example, from a line of endothelial cells from human umbilical cord veins (Verweij, C. L. et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4699-4717), or from human platelet RNA, for example, according to the protocol described by Ware et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 2946-2950). The cellular RNA is purified using the extraction technique with guanidine thiocyanate initially described by Cathala et al. (DNA 4 (1983) 329-335) and used as template for the synthesis of complementary DNA (cDNA) including the part of vWF to be amplified. In a first step, the synthesis of the noncoding strand is carried out using the kit distributed by Amersham and an oligodeoxynucleotide which is complementary to the nucleotide sequence of the mRNA coding for the contiguous residues located at the C-terminal of the part to be amplified. The resulting solution is then subjected to three enzymatic amplification cycles by the PCR technique using as primer the preceding oligodeoxynucleotide and a oligodeoxynucleotide identical to the nucleotide sequence coding for contiguous residues located at the N-terminal of the part of vWF to be amplified. The amplified fragments are then cloned in vectors of the M13 type for their verification by sequencing using either the universal primers located on both sides of the cloning multisite, or specific oligodeoxynucleotides of the amplified region of the vWF gene for which the sequence of several isomorphs is known (Sadler, J. E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij, C. L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes, B. B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171; Bontron, D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127). Plasmid pET-8c52K is particularly useful because it comprises a fragment of the cDNA of vWF coding for residues 445-733 of human vWF and notably it includes the peptides G10 and D5, which are antagonists of the interaction between vWF and GP1b (Mori, H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904). The fragment of vWF present in plasmid p5E is identical to the fragment of vWF of plasmid pET-8c52K except that the cysteine residues at positions 459, 462, 464, 471 and 474 were mutated into glycine residues by directed mutagenesis. Plasmid p7E is identical to plasmid p5E except that the cysteine

residues at positions 509 and 695 were also mutated into glycine residues by directed mutagenesis.

Example 2: Construction of a MstII-HindIII restriction fragment including a binding site of vWF to blood platelets

E.2.1 Peptide of the type P1-X-P2

E.2.1.1 Thr470-Val713 residues of vWF

The PCR amplification of the plasmid pET-5c52K with the oligodeoxynucleotides 5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, the BamHI and MstII sites are underlined) and 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGACTTGCCATGTCG-3' (Sq2029, the BamHI and HindIII sites are underlined), generates a fragment which includes the Thr470 to Val713 residues of vWF (see Figure 1, Thr586 to Val829 residues). The amplified fragments are first cut with BamHI, cloned in the BamHI site of a vector of the pUC type, and the sequence of a clone is verified by sequencing. The peptide sequence so amplified comprises an MstII-HindIII restriction fragment including the Thr470 to Val713 residues of vWF, whose peptide sequence is identical to the corresponding sequence described by Titani et al. (*Biochemistry* 25 (1986) 3171-3184). Plasmid pYG1220 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.1.2 Residues Thr470-Pro704 of vWF

Residue 705 of natural vWF is O-glycosylated and located inside peptide D5, defined by the Leu694 to Pro708 residues of vWF (Mori, H. et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17901-17904). In addition, it is known that a treatment of natural vWF with neuraminidase, whose function is to release the terminal sialic acids of the glycosylations of mammalian cells, allows the exposure of the binding sites of vWF to platelet GPIb in the absence of platelet agglutination factors such as botrocetin, for example. Thus, it is possible that the suppression of all or part of the O-glycosylation sites of recombinant vWF, and notably secreted by a yeast where it is assumed that the O-glycosylation lacks sialic acids, generates a product which is intrinsically capable of recognizing the platelet GPIb in the absence of such cofactors. A MstII-HindIII fragment including the Thr470 to Pro704 residues of vWF is thus generated in a manner similar to the preceding example: the fragments resulting from the PCR amplification of the plasmid p5E with the oligodeoxynucleotides 5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTAACCGGTGAAGCCGGC-3' (Sq2149, the BamHI and MstII sites are underlined) and 5'-CCATGGATCCAAGCTTAAGGA-GGAGGGGCTTCAGGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, the BamHI and HindIII sites are underlined) are first cloned in a vector of the pUC type in the form of a BamHI restriction fragment, and the sequence of a clone is verified by sequencing. The sequence of the MstII-HindIII fragment so

generated corresponds to the corresponding sequence given in Figure 1 except that the codon TAA specifying the translation stop is located immediately downstream of the Pro704 residue of vWF and residues 471 and 474 are glycine residues and not cysteine residues. Plasmid pYG1310 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.1.3 Leu494-Pro704 residues of vWF

The peptide sequence present in plasmid pYG1310 also has threonine or serine residues in positions 485, 492, 493 and 500 which are naturally O-glycosylated in the native molecule of human vWF, located in the immediate proximity of peptide G10 defined by Mori et al. (J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904). The amplification by the PCR technique of the plasmid pET8C-52K by the oligodeoxynucleotides 5'-CCCGGGTACCTTAGGCTTACTGTATGTGGA-GGACATC-3' (Sq3037, the KpnI and MstII sites are underlined) and 5'-CCATGGATCCAAGC-TTAAGGAGGAGGGGCTTCAGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, the BamHI and HindIII sites are underlined) generates a fragment including the Leu494 to Pro704 residues of vWF. The amplified fragments are first cut by the KpnI and BamHI enzymes to be cloned in a vector of the pUC type cut by the same enzymes. A particular clone is isolated which corresponds to the expected sequence verified by sequencing. This KpnI-BamHI fragment thus comprises a MstII-HindIII fragment including the Leu494 to Pro704 residues of human vWF. Plasmid pYG1373 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.1.4 Tyr508-Pro704 residues of vWF

The peptide sequence present after PCR amplification in plasmid pYG1373 still has the threonine residue in position 500, which is naturally O-glycosylated in the native molecule of human vWF. The amplification by the PCR technique of plasmid pET8C-52K by the oligodeoxynucleotides 5'-CCCGGGTACCTTAGGCTTACTGCAGCAGGCTACTGGACC-TG-3' (Sq2621, the KpnI and MstII sites are underlined) and 5'-CCATGGATCCAAGCTTAAG-GAGGAGGGGCTTCAGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, the BamHI and HindIII sites are underlined) generates a fragment including the Tyr508 to Pro704 residues of vWF. The amplified fragments are first cut by the KpnI and BamHI enzymes to be cloned in a vector of the pUC type cut by the same enzymes. A particular clone is isolated which corresponds to the expected sequence verified by sequencing. This KpnI-BamHI fragment thus comprises a MstII-HindIII fragment including the Tyr508 to Pro704 residues of human vWF. Plasmid pYG1309 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.1.5 Residues Pro502-Pro704 of vWF

The peptide sequence corresponding to the Pro502 to Pro704 residues of human vWF is generated from the preceding plasmid by the insertion of the oligodeoxynucleotides 5'-TTAGGGTTACCACCTTGATGACTTCTACTGCA-3' (Sq2751) and 5'-GTAGAAGTCATGCAAAGGTGGTAACCC-3' (Sq2752) which by pairing can be cloned between the MstII and PstI sites of the plasmid obtained after PCR amplification according to Example E.2.1.4, which allows the generation of a MstII-HindIII restriction fragment including the Pro502 to Pro704 residues of human vWF. Plasmid pYG1350 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.2 Thr470-Asp498 residues of vWF: peptide of type P1

In a particular embodiment, the binding site of vWF is a peptide including the Thr470 to Asp498 residues of mature vWF. This sequence, included in peptide G10 (Cys474-Pro488), was described by Mori et al. (J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904) and it is capable of antagonizing the interaction of human vWF with GP1b of human platelets. The sequence including peptide G10 is first generated in the form of a MstII-HindIII restriction fragment, for example by means of the PCR amplification technique or directly with the aid of synthetic oligodeoxynucleotides. For example, the PCR amplification products of plasmid pET-8c52K with the oligodeoxynucleotides Sq1969 and 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGTCCTCACATA-CAG-3' (Sq1970, the BamHI and HindIII sites are underlined) are first cut by the BamHI enzyme and then cloned in the BamHI site of a vector of the pUC type. A particular clone is isolated which corresponds to the expected sequence verified by sequencing. This BamHI fragment thus comprises a MstII-HindIII fragment including the Thr470 to Asp498 residues of human vWF. Plasmid pYG1210 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.3 Residues Leu694-Pro708 of vWF: peptide of type P2

In a second embodiment, the binding site of vWF to GP1b is directly devised with the aid of synthetic oligodeoxynucleotides, and for example the oligodeoxynucleotides 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCCTGAAGCCCCCTCCTACTCTGCCCTAAGCTTA-3' and 5'-GATCTAACGCTTAGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGGCTTCAGGGGCCAGGTACAGAGGCC-3'. These oligodeoxynucleotides form by pairing an MstII-BglII restriction fragment including the MstII-HindIII fragment corresponding to peptide D5 defined by the Leu694 to Pro708 residues of vWF (Mori, H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-

17904). Plasmid pYG1204 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B).

E.2.4 Peptide of the type P1-XD-P2

Useful variants of plasmid pET-8c52K are deleted by directed mutagenesis between peptides G10 and D5, for example the collagen and/or heparin and/or botrocetin and/or sulfatide and/or ristocentin binding sites. An example is plasmid pMMB9, deleted by directed mutagenesis between the Cys509 and Ile662 residues. PCR amplification of this plasmid with the oligodeoxynucleotides Sq1969 and Sq2029 generates a MstII-HindIII restriction fragment including the Thr470 to Tyr508 and Arg663 to Val713 residues and in particular peptides G10 and D5 of vWF, and in particular its collagen binding site located between the Glu542 and Met622 residues is deleted (Roth, G. J. et al., Biochemistry 25 (1986) 8357-8361). Plasmid pYG1217 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B). In other embodiments, the use of combined techniques of directed mutagenesis and PCR amplification allows the generation at will of the MstII-HindIII restriction fragment of Figure 1, except that one or more sulfatide and/or botrecetine and/or heparin and/or collagen binding sites has (have) been deleted.

E.2.5 Peptide of type P1-X*-P2

E.2.5.1 Conformational alteration by substitution of the cysteine residues

The PCR amplification products of plasmids p5E and p7E with the oligodeoxynucleotides Sq2149 (5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCGGTGAAGCCGGC-3', the BamHI and MstII sites are underlined) and Sq2029 are first cloned in a vector of the pUC type in the form of a BamHI restriction fragment, and the sequence of a clone is verified by sequencing. The sequence of the MstII-HindIII fragment so generated corresponds to the corresponding sequence given in Figure 1 except that residues 471 and 474 of vWF are glycine residues and not cysteine residues. Plasmid pYG1271 comprises this MstII-HindIII restriction fragment preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B). Plasmid pYG1269 is generated in a similar manner except that plasmid p7E is used as the template in the PCR amplification by the oligodeoxynucleotides Sq2149 and Sq2029.

E.2.5.2 Conformational alteration by introduction of mutations of type IIB

Other particularly useful mutations concern at least one residue involved in pathologies of type IIB associated with vWF (increase in the intrinsic affinity of vWF for GP1b), such as the Arg543, Arg545, Trp550, Val551, Val553, Pro574 or Arg578 residues for example. The in vitro genetic recombination techniques also allow the introduction at will of one or more

supplementary residues in the sequence of vWF, and for example a supernumerary methionine between the positions Asp539 and Glu542. In a particular example, the mutations Arg543>Trp543 (R543W) and Pro574->Leu574 (P574L) are introduced by directed mutagenesis with the aid of the oligodeoxynucleotides 5'-GTGCTGAAGGCCTTGTGGTCGACATGATG-GAGTGGCTCGGATATCCCAGAAGTGGTAGCGGTGCCGTGGAGTACC-3' (Sq2851; the codon specifying the Arg543 residue is underlined) and 5'-GGGCTCAAGGACC-GGAAGCGCTTAAGCGAGCTGCAGCGCATTGCCAGCCAG-3' (Sq2855; the codon specifying the residue Leu574 is underlined), respectively. After verification of the nucleotide sequence, one thus generates MstII-HindIII restriction fragments including the mutants of type IIB of human vWF R543W and P2574L. Plasmids pYG1359 (R543W) and pYG1360 (P574L) comprise these MstII-HindIII restriction fragments preceded by the HindIII-MstII fragment of plasmid pYG404 (see Example 4 and Figure 3B). The mutagenesis with the aid of the oligodeoxynucleotide Sq2851 also introduces the SalI, EcoRV and MluI sites at the Val538, Ile546 and Val551 positions, respectively. These restriction sites are not present in the corresponding natural sequence of human vWF and they are thus particularly useful to easily introduce any desirable mutation between the Val538 and Val551 residues. As an example, the oligodeoxynucleotides 5'-ATCCCAGAAGTGCGTA-3' (Sq3017, the codon specifying the mutant of type IIB Cys550 is underlined) and 5'-CGCGTACGCACTTCTGGGAT-3 (Sq3018) form by a pairing an EcoRV-MluI restriction fragment which can be cloned in plasmid pYG1359 cut by the EcoRV and MluI enzymes, which generate plasmid pYG1374 comprising the mutations R543W and W550C (Figure 3B). In the same manner, the oligodeoxynucleotides 5'-TCGACATGATGGAGCGGCTCGGAT-3' (Sq3019, the codon specifying the Arg543 residue originating from the natural sequence is underlined) and 5'-ATCCGCAGCCGCTCCAT-CATG-3' (Sq3020) form by pairing an SalI-EcoRV restriction fragment which can be cloned in plasmid pYG1374 cut by the SalI and EcoRV enzymes, which generates plasmid pYG1386 which comprises only the mutation W550C (Figure 3B).

Example 3: Construction of a MstII/HindIII restriction fragment including a binding site of vWF to the subendothelium

In a particular embodiment, the binding sites of vWF to the components of the subendothelial tissue, and of collagen in particular, are generated by PCR amplification of plasmid pET-8c52K. For example, the use of the oligodeoxynucleotides Sq2258 (5'-GGATCC-TTAGGGCTGTGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', the MstII site is underlined) and Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTAACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', the HindIII site is underlined) allows the generation of plasmid pYG1254, whose MstII-HindIII restriction fragment includes the Cys509 to Cys695 residues of natural vWF (peptide of type X). The

ligation of this restriction fragment with the HindIII-MstII restriction fragment of plasmid pYG404 (see Example 4) generates the HindIII restriction fragment of plasmid pYG1276 (Figure 3B).

Molecular variants of types XD (see E.2.4) or X* (see E.2.5) can also be generated according to the same strategy, and they comprise any desirable combination between the binding sites of vWF to the sulfatides and/or to botrocetin and/or heparin and/or collagen and/or any residue responsible for a modification of the affinity of vWF for GP1b (pathologies of type II associated with vWF). In another embodiment, the domain capable of binding to collagen can also originate from the fragment of vWF between residues 911 and 1114 and described by Pari et al. (J. Biol. Chem. (1987) 262: 13835-13841).

Example 4: Coupling at C-terminal of HSA

Plasmid pYG404 is described in the patent application EP 361 991. This plasmid comprises a HindIII restriction fragment coding for the prepro-HSA gene preceded by 21 nucleotides naturally present immediately upstream from the translation initiator ATG of the PGK gene of *S. cerevisiae*. This fragment comprises a HindIII-MstII restriction fragment corresponding to the totality of the gene coding for the HSA with the exception of the three amino acids closest to the C-terminal (leucine-glycine-leucine residues). The ligation of this fragment with any one of the MstII-HindIII fragments described in Examples 2 or 3 allows the generation of HindIII restriction fragments including composite genes coding for chimeric proteins in which a fragment of vWF having special properties is positioned in the translation reading frame at the C-terminal of the HSA molecule. Such composite genes are exemplified in the table of Figure 3B.

Example 5: Coupling at the N-terminal of HSA

In a particular embodiment, the combined techniques of directed mutagenesis and PCR amplification allow the construction of hybrid genes coding for a chimeric protein resulting from the translational coupling between a signal peptide (and, for example, the prepro region of HSA), a sequence including a fragment of vWF which has properties of adhesion and the mature form of the HSA or one of its molecular variants. These hybrid genes are preferably flanked at 5' of the translation initiation ATG and at 3' of the translation stop codon by HindIII restriction sites, which allows the generation of expression plasmids for these chimeric proteins, for example according to the strategy detailed in the following example.

Example 6: Expression plasmids

The chimeric proteins of the preceding examples can be expressed in yeasts from functional regulable or constitutive promoters such as for example those present in plasmids pYG105 (LAC4 promoter of *Kluyveromyces lactis*), pYG106 (PGK promoter of *Saccharomyces cerevisiae*), pYG536 (PHO5 promoter of *S. cerevisiae*), or hybrid promoters such as those described in the patent application EP 361 991. Plasmids pYG105 and pYG106 are particularly useful here, because they allow the expression of genes coded by the HindIII restriction fragments of Examples E.4 and E.5 from functional promoters in *K. lactis*, regulable (pYG105) or constitutive (pYG106). Plasmid pYG105 corresponds to plasmid pKan707 described in the patent application EP 361 991 in which the unique HindIII restriction site located in the gene of resistance to geneticin (G418) was destroyed by directed mutagenesis while preserving an unchanged protein (oligodeoxynucleotide 5'-GAAATGCATAAGCTTGCATTCTCACCG-3'). The SalI-SacI fragment coding for the URA3 gene of the mutated plasmid was then replaced by a SalI-SacI restriction fragment comprising an expression cassette consisting of the LAC4 promoter of *K. lactis* (in the form of a SalI-HindIII fragment) and of the terminator of the PGK gene of *S. cerevisiae* (in the form of a HindIII-SacI fragment). Plasmid pYG105 is mitotically very stable in the *Kluyveromyces* yeasts and a restriction map of it is given in Figure 3. Plasmids pYG105 and pYG106 differ only in the nature of the transcription promoter encoded by the SalI-HindIII fragment. As an example, the cloning "in the productive orientation" (defined as the orientation which places the "prepro" region of the albumin proximally with respect to the transcription promoter) of HindIII restriction fragments of plasmids pYG1220, pYG1310, pYG1373, pYG1309, pYG1350, pYG1210, pYG1204, pYG1217, pYG1269, pYG1271, pYG1359, pYG1360, pYG1374, pYG1386 and pYG1276, in the HindIII site of plasmid pYG105 generates the expression plasmids pYG1248, pYG1313, pYG1375, pYG1311, pYG1355, pYG1214, pYG1206, pYG1223, pYG1279, pYG1283, pYG1361, pYG1365, pYG1377, pYG1389 and pYG1277, respectively.

Example 7: Transformation of yeasts

The transformation of yeasts belonging to the genus *Kluyveromyces*, and in particular the MW98-8C and CBS 293.91 strains of *K. lactis*, is carried out for example using the whole cell treatment technique employing lithium acetate (Ito, H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168), adapted as follows. The growth of the cells is carried out at 28°C in 50 mL of YPD medium with stirring and until the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) is between 0.6 and 0.8; the cells are harvested by centrifugation at low speed, washed in a sterile solution of TE (10mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA), resuspended in 3-4 mL of lithium acetate (0.1M in TE) to obtain a cell density of approximately 2 x 10⁸ cells/mL, and then incubated at 30°C for 1 h under moderate

stirring. Aliquots of 0.1 mL of the resulting suspension of competent cells are incubated at 30°C for 1 h in the presence of DNA and at a final concentration of 35% polyethylene glycol (PEG₄₀₀₀, Sigma). After a 5 min thermal shock at 42°C, the cells are washed 2 times, resuspended in 0.2 mL sterile water and incubated for 16 h at 28°C in 2 mL of YPD medium to allow the phenotypic expression of the G418 resistance gene, expressed under the control of the P_{k1} promoter (see EP 361 991); 200 µL of the cell suspension are then spread on selective YPD Petri dishes (G418, 200 µg/mL). The Petri dishes are then incubated at 28°C and the transformants appear after 2-3 days of cell growth.

Example 8: Secretion of the chimeras

After selection on a rich medium supplemented with G418, the recombinant clones are tested for their capacity to secrete the proteins chimeric between HSA and vWF. Some clones corresponding to the CBS 293.91 strain, transformed, for example, with plasmids pYG1214 (HSA-P1), pYG1206 (HSA-P2), pYG1223 (HSA-P1-XD-P2) and pYG1248 (HSA-P1-X-P2) or pKan707 (control vector) are incubated in YPD or YPL medium at 28°C. The cell supernatants are recovered by centrifugation when the cells reach the stationary growth phase, they are optionally concentrated 10 times by precipitation for 30 min at -20°C at a final concentration of 60% ethanol, and then tested after electrophoresis on an 8.5% SDS-PAGE gel or directly by staining the gel with Coomassie blue, or after immunoblot using, as primary antibodies, mouse antibodies directed against vWF or a polyclonal rabbit serum directed against HSA. In the immunological detection experiments, the nitrocellulose filter is first incubated in the presence of specific primary antibodies, washed several times, incubated in the presence of sheep antimouse antibodies (anti-vWF immunoblot) or sheep antirabbit antibodies (anti-HSA immunoblot), and then incubated in the presence of an avidinperoxidase complex using the "ABC kit" distributed by Vectastain (Biosys, S.A., Compiègne, France). The immunological reaction is then developed by the addition of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Prolabo) in the presence of hydrogen peroxide, according to the manufacturer's recommendations. The results of Figures 4-8 demonstrate that the yeast *K. lactis* is capable of secreting proteins chimeric between HSA and a fragment of vWF, and that these chimeras are recognized by antibodies specific for HSA or vWF.

Example 9: Purification and molecular characterization of the secreted products

The chimeras present in the culture supernatants correspond to the CBS 293.91 strain, transformed, for example, by the expression plasmids according to Example 6, are characterized in a first step by means of specific antibodies for the HSA part and the vWF part. The results of Figures 4-8 demonstrate that the yeast *K. lactis* is capable of secreting proteins chimeric between

HSA and the fragment of vWF, and that these chimeras are immunologically reactive. It can also be desirable to purify some of these chimeras. The culture is then centrifuged (10,000 G, 30 min), the supernatant is passed through a 0.22 mm [sic; μm] filter (Millipore), and then concentrated by ultrafiltration (Amicon) using a membrane whose discrimination threshold is at 30 kd. The concentrate obtained is then dialized against a solution of Tris-HCl (50 mM, pH 8) and then purified on a column. For example, the concentrate corresponding to the culture supernatant of the CBS 293.91 strain transformed by plasmid pYG1206 is purified by affinity chromatography on Blue-Trisacryl (IBF). Purification by ion-exchange chromatography can also be used. For example, in the case of the chimera HSA-vWF470-713, the concentrate obtained after ultrafiltration is dialyzed against a solution of Tris-HCl (50 mM, pH 8) and then deposited in 20 mL fractions on a column (5 mL) of a cation-exchanger (S Fast Flow, Pharmacia) equilibrated in the same buffer. The column is then washed several times with the solution of Tris-HCl (50 mM, pH 8) and the chimeric protein is then eluted from the column by a gradient (0-1M) of NaCl. The fractions containing the chimeric protein are then combined and dialyzed against a solution of Tris-HCl 50 mM (pH 8), and then reapplied to an S Fast Flow column. After elution of the column, the fractions containing the protein are combined, dialyzed against water, and lyophilized before characterization: for example, the sequencing (Applied Biosystem) of the protein (HSA-vWF470-704 C471G, C474G) secreted by the yeast CBS 293.91 gives the expected N-terminal sequence of HSA (Asp-Ala-His...), demonstrating a correct maturation of the chimera immediately at the C-terminal of the doublet of the Arg-Arg residues of the "pro" region of HSA (Figure 1). The essentially monomeric character of the chimeric proteins between HSA and vWF is also confirmed by their elution profile on a TSK 3000 column (Toyo Soda Company, equilibrated by a solution of cacodylate (pH 7) containing 0.2M Na₂SO₄): for example, the chimera (HSA-vWF 470-704 C471G, C474G) behaves under these conditions like a protein having an apparent molecular weight of 95 kd, demonstrating its monomeric character.

Example 10: Antagonist activity of the genetic hybrids between HSA and vWF for platelet agglutination

The antagonistic activity of the products is determined by measuring the dose-dependent inhibition of the agglutination of human platelets fixed by paraformaldehyde according to the method described by Prior et al. (Bio/Technology (1992) 10: 66). The measurements are carried out in aggregometer (PAP-4, Bio Data, Horsham, PA, USA), which records the variations over time in the optical transmission under stirring at 37°C in the presence of vWF, botrocetin (8.2 mg/mL) and of the product to be tested at different dilutions (concentrations). For each measurement, 400 mL (8×10^7 platelets) of a suspension of human platelets stabilized with paraformaldehyde (0.5%, then resuspended in (NaCl (137 mM); MgCl₂ (1 mM); NaH₂PO₄

(0.36 mM); NaHCO₃ (10 mM); KCl (2.7 mM); glucose (5.6 mM); HSA (3.5 mg/mL); HEPES buffer (10 mM, pH 7.35)) are preincubated at 37°C in the cylindrical cuvette (8.75 x 50 mm, Wellcome Distriwell, 159 rue Nationale, Paris) of the aggregometer for 4 min, and then 30 mL of the solution of the product to be tested are added at different dilutions in an apyrogenic formulation vehicle (mannitol (50 g/L); citric acid (192 mg/L); L-lysine monohydrochloride (182.6 mg/L); NaCl (88 mg/L); pH adjusted to 3.5 by the addition of NaOH (1M)), or of formulation vehicle only (control test). The resulting suspension is then incubated for 1 min at 37°C and one adds 12.5 mL of human vWF (American Bioproducts, Parsippany, NJ, USA; 11% of von Willebrand activity measured according to the recommendations for use of the PAP-4 (Platelet Aggregation Profiler®) with the aid of platelets fixed in formaldehyde (2×10^5 platelets/mL), human plasma containing 0-100% vWF and ristocetin (10 mg/mL, see pp. 36-45: vW Program™) which one incubates at 37°C for 1 min before adding 12.5 mL of the botrocetin solution (purified from lyophilized venom from *Bothrops jararaca* (Sigma), according to the protocol described by Sugimoto et al., Biochemistry (1991) 266; 18172). The recording of the reading of the transmission as a function of time is then carried out for 2 min under stirring with the aid of a magnetized bar (Wellcome Distriwell) placed in the cuvette and under magnetic stirring at 1100 rpm ensured by the aggregometer. The mean variation in the optical transmission (n^35 for each dilution) over time is thus a measurement of the platelet agglutination due to the presence of vWF and of botrecetine, in the absence or in the presence of variable concentrations of the product to be tested. From such recordings one then determines the % inhibition of the platelet agglutination due to each concentration of the product, and one traces the straight line giving the % inhibition as a function of the inverse of the dilution of the product on a log-log scale. The IC₅₀ (or concentration of product causing 50% inhibition of the agglutination) is then determined on this straight line. The table of Figure 9 compares the IC₅₀ of several HSA-vWF chimeras of the present invention and it demonstrates that some of them are better antagonists of platelet agglutination than the product RG12986 described by Prior et al. (Bio/Technology (1992) 10: 66) and included in the tests as a calibration value. Identical tests of the inhibition of the agglutination of human platelets in the presence of vWF from porcine plasma (Sigma) in addition allows the demonstration that some of the hybrids of the present invention, and notably some variants of type IIB, are very good antagonists of platelet agglutination in the absence of cofactors of the botrocetin type. The botrocetin-independent antagonism of these particular chimeras can also be demonstrated according to the protocol initially described by Ware et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 2946) by displacement of the monoclonal antibody ¹²⁵I-LJ-IB1 (10 mg/mL), a competitive inhibitor of the binding of vWF to platelet GPIb (Handa, M. et al., (1986) J. Biol. Chem. 261: 12579) after 30 min of incubation at 22°C in the presence of fresh platelets (10^8 platelets/mL).

List of sequences

(2) Information for SEQ ID NO: 1:

(i) Characteristics of the sequence:

- (A) Length: 2591 bp
- (B) Type: nucleic acid
- (C) Number of strands: double
- (D) Configuration: linear

(ii) Type of molecule: cDNA

(iii) Hypothetical: no

(iv) Antisense: no

(ix) Additional characteristic:

- (A) Name/key: CDS
- (B) Location: 26..2587

Claims

1. Recombinant polypeptide consisting of an adhesive part derived from the structure of vWF capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to platelets and/or the subendothelium, and of a part allowing its stabilization and *in vivo* presentation.

2. Polypeptide according to Claim 1, characterized in that the adhesive part consists in its entirety or in part of the peptide sequence between residues 445 and 733 of vWF or a variant thereof.

3. Polypeptide according to Claim 2, characterized in that the adhesive part presents a structure chosen from:

- (a) the peptide sequence between residues 445-733 of vWF, or,
- (b) a part of peptide sequence (a) capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to GP1b and/or to the subendothelium, or
- (c) a structure derived from structures (a) or (b) by structural modifications (mutation, substitution, addition and/or deletion of one or more residues) and capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to GP1b and/or to the subendothelium, or
- (d) a non-natural peptide sequence, for example one isolated from random peptide banks, and capable of at least partially antagonizing the binding of vWF to GP1b and/or the subendothelium.

4. Polypeptide according to Claim 3, characterized in that the adhesive part consists of a sequence chosen from the peptides of type P1, P2, X, XD and X* or any combination of these peptides with each other.

5. Polypeptide according to Claim 4, characterized in that the combination of peptides is chosen from the peptides of type P1-P2, P1-X, P1-XD, P1-X*, X-P2, XD-P2, X*-P2, P1-X-P2, P1-XD-P2 and P1-X*-P2.

6. Polypeptide according to Claim 4, characterized in that the adhesive part consists of any peptide of a type defined in Claims 4 and 5 represented more than once.

7. Polypeptide according to one of Claims 1-6, characterized in that the adhesive part is coupled to the N-terminal end of the stabilizing structure.

8. Polypeptide according to one of Claims 1-6, characterized in that the adhesive part is coupled to the C-terminal end of the stabilizing structure.

9. Polypeptide according to one of Claims 1-8, characterized in that the stabilizing structure is a polypeptide having a high plasma half-life.

10. Polypeptide according to Claim 9, characterized in that the polypeptide having a high plasma half-life is a protein such as albumin, apolipoprotein, an immunoglobulin or a transferrin.

11. Polypeptide according to Claim 9, characterized in that the polypeptide having a high plasma half-life is derived by structural modification(s) (mutation, substitution, addition and/or deletion of one or more residues, chemical modification) of a protein according to Claim 10.

12. Polypeptide according to one of Claims 9-11, characterized in that the stabilizing structure is a weakly immunogenic or nonimmunogenic polypeptide for the organism in which it is used.

13. Polypeptide according to Claim 9, characterized in that the stabilizing structure is an albumin or a variant of albumin.

14. Nucleotide sequence coding for a polypeptide according to any one of Claims 1-13.

15. Nucleotide sequence according to Claim 14, characterized in that it comprises a "leader" sequence allowing the secretion of the polypeptide expressed.

16. Expression cassette comprising a nucleotide sequence according to one of Claims 14 or 15 under the control of a transcription initiation region and optionally a transcription termination region.

17. Self-replicating plasmid comprising an expression cassette according to Claim 16.

18. Eukaryotic or prokaryotic recombinant cell into which a nucleotide sequence according to one of Claims 14 or 15, or an expression cassette according to Claim 16, or a plasmid according to Claim 17, has been inserted.

19. Recombinant cell according to Claim 18, characterized in that it is a yeast, an animal cell, a fungus or a bacterium.

SEQ. ID NO.: 1

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	-12
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His	9
CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GGC TTT GCT CAG Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Ile Ala Phe Ala Gln	29
TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe	49
GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu	69
TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp	89
TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	109
CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp	129
AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe	149
TAT GCC CGG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC Tyr Ala Pro Glu Leu Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	169
CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly	189
AAG CCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg	209
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala	229
GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	249

Figure 1 (a)

CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT
 Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp 269

TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC
 Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys 289

ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT
 Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe 309

GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG
 Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met 329

TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT
 Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu 349

GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC
 Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Ala Ala Asp Pro His Glu Cys 369

TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA
 Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys 389

CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT
 Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val 409

CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC
 Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn 429

CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA
 Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala 449

GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACC CCA GTC
 Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val 469

AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TCC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA
 Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser 489

GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe 509

CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT
 His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu 529

GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT
 Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp 549

GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT CCC
 Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala 569

^{MstII}
 GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GGC TTA GGC TTA ACC TGT GAA GCC
 Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala
 SAH<---I--->VWF 589

Figure 1 (b)

TGC CAG GAG CCG GGA CGC CTG GTG GTG CCT CCC ACA GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT
 Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr 609

PstI

CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC GAT TTC TAC ~~TGC~~ AGC AGG CTA CTG
 Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe ~~Tyr~~ Cys Ser Arg Leu Leu 629

GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GCC TCC TCC AGG CTG TOC GAG CCT GAG TTT GAA GTG CTG
 Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu 649

AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CGG CTG CGC ATC TOC CAG AAG TGG GTC CGC GTG
 Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val 669

GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC CGC TCC CAC GGC TAC ATC CGG CTC AAG GAC CGG AAG CGA
 Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg 689

CCG TCA GAG CTG CGG CGC ATT GCC AGC CAG GTG AAG TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC
 Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser 709

ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC TTC AGC AAG ATC GAC CGC CCT GAA
 Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu 729

GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG GAG CGC CAA CGG ATG TCC CGG AAC
 Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn 749

TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC CTG AAG AAG AAG GTC ATT GTG ATC CGG GTG GGC ATT
 Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile 769

GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG CAG ATC CGC CTC ATC GAG AAG CAG GGC CCT GAG AAC AAG
 Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys 789

GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG CAA AGG GAC GAG ATC GTT AGC TAC
 Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr 809

CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT CTG CCC CCC GAC ATG GCA CAA GTC
 Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro ~~Pro~~ Thr Leu Pro ~~Pro~~ Asp Met Ala Gln Val 829

TAA GCTT

Figure 1 (c)

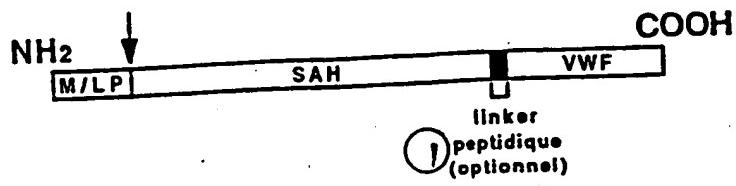


Figure 2B

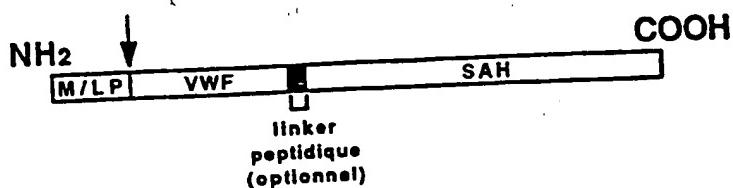


Figure 2C

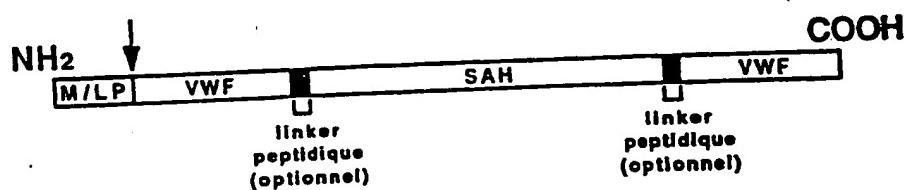


Figure 2

Key: 1 (optional) peptide linker

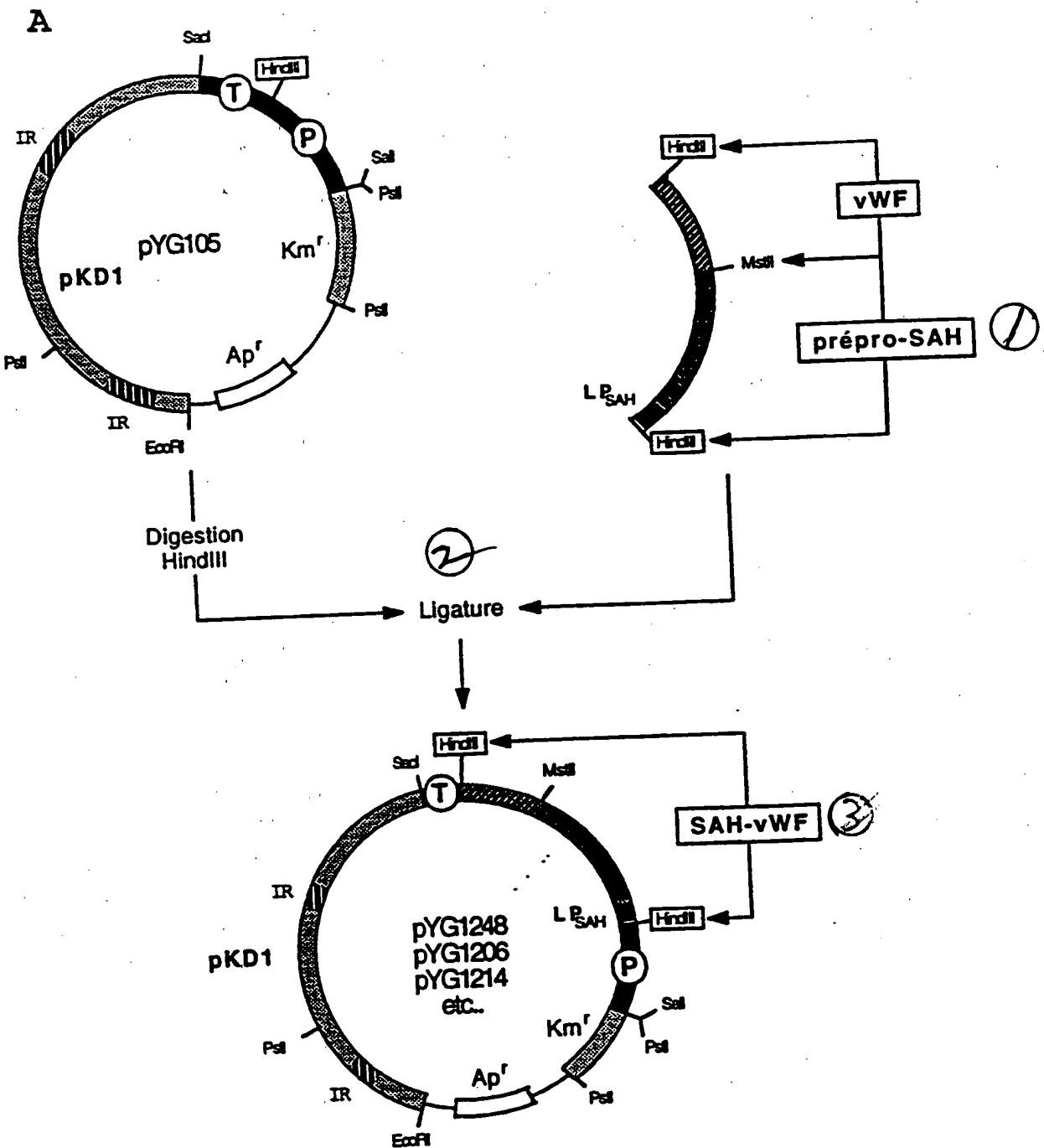


Figure 3 (a)

Key: 1 prepro HSA
 2 Ligation
 3 HAS-vWF

B

PLASMIDE HSA-vWF	STRATEGIE D'OBTENTION	CARACTERISTIQUES	O-GLYCOSYLATION POTENTIELLE	PLASMIDE D'EXPRESSION
pYG1220	① PCR sur pET-8c52K (Sq1969+Sq2029)	vWF470->713	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1248
pYG1310	② PCR sur pSE (Sq2149+Sq2622)	vWF470->704 C471G; C474G	T485; T492; T493; S500	pYG1313
pYG1373	③ PCR sur pET-8c52K (Sq3037+Sq2622)	vWF494->704	S500	pYG1375
pYG1309	④ PCR sur pET-8c52K (Sq2621+Sq2622)	vWF508->704	NONE	pYG1311
pYG1350	⑤ substitution du fragment MstII-PstI de pYG1309 par Sq2751+Sq2752	vWF502->704	NONE	pYG1355
pYG1210	⑥ PCR sur pET-8c52K (Sq1969+Sq1970)	vWF470->498	T485; T492; T493;	pYG1214
pYG1204	⑦ insertion du fragment MstII-BglII au site MstII de la SAH	vWF694->708	T705	pYG1206
pYG1217	⑧ PCR sur pMMB9 (Sq1969+Sq2029)	vWF470->713 Δ509-662	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1223
pYG1269	⑨ PCR sur pZE (Sq2149+Sq2029)	vWF470->713 C471G; C474G; C509G; C695G	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1279
pYG1271	⑩ PCR sur pSE (Sq2149+Sq2029)	vWF470->713 C471G; C474G	T485; T492; T493; S500; T705	pYG1283
pYG1359	⑪ mutagénèse par Sq2851	vWF470->704 C471G; C474G; R543W	T485; T492; T493; S500	pYG1361
pYG1360	⑫ mutagénèse par Sq2855	vWF470->704 C471G; C474G; P574L	T485; T492; T493; S500	pYG1365
pYG1374	⑬ substitution du fragment EcoRV-MluI de pYG1359 par Sq3017+Sq3018	vWF470->704 C471G; C474G; R543W; W550C	T485; T492; T493; S500	pYG1377
pYG1386	⑭ substitution du fragment SalI-EcoRV de pYG1374 par Sq3019+Sq3020	vWF470->704 C471G; C474G; W550C	T485; T492; T493; S500	pYG1389
pYG1276	⑮ PCR sur pET-8c52K (Sq2258+Sq2259)	vWF509->695	NONE	pYG1277

Figure 3 (b)

- Key: 1 HAS-vWF Plasmid
2 Strategy for obtaining
3 Characteristics
4 Potential O-glycosylation
5 Expression plasmid
6 On
7 Substitution of the MstII-PstI fragment of pYG1309 by Sq2751 + Sq2752
8 Insertion of the MstII-BglIII fragment at the MstII site of HSA
9 Mutagenesis by
10 Substitution of the EcoRV-MluI fragment of pYG1359 by Sq3017 + Sq3018
11 Substitution of the SalI-EcoRV fragment of pYG1374 by Sq3019 + Sq3020

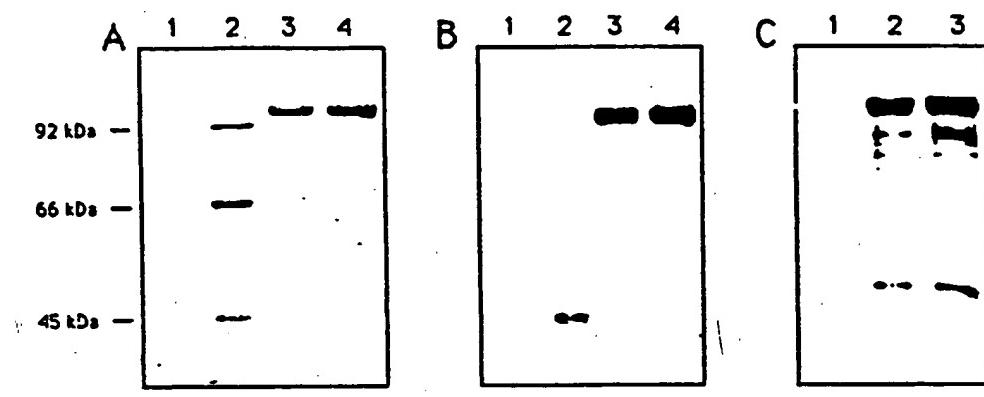


Figure 4

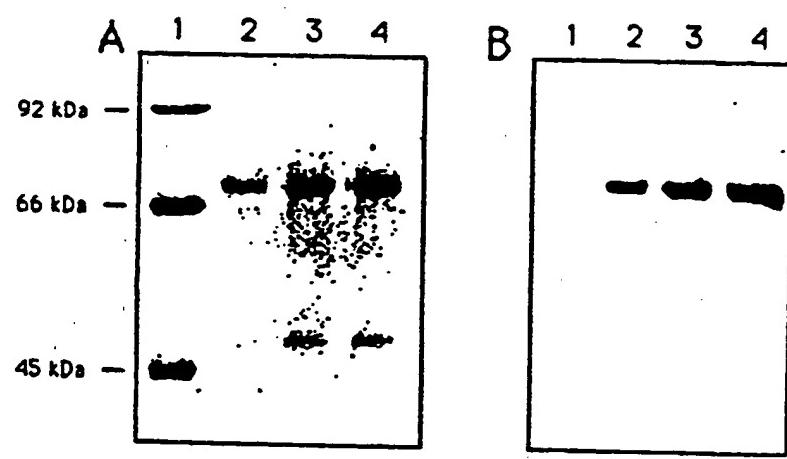


Figure 5

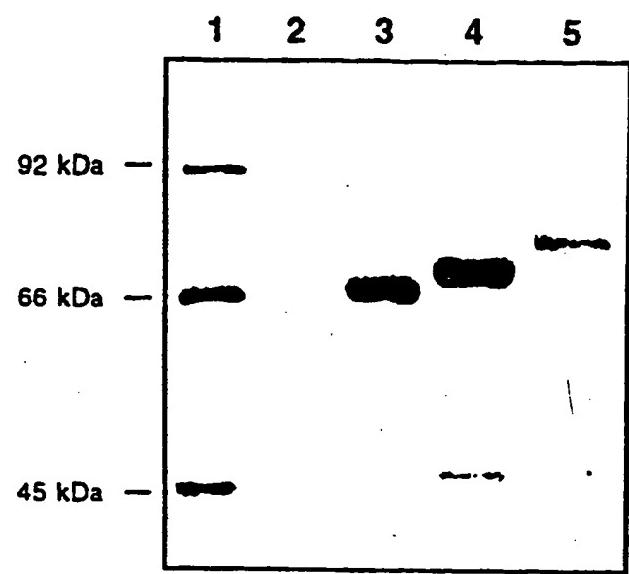


Figure 6

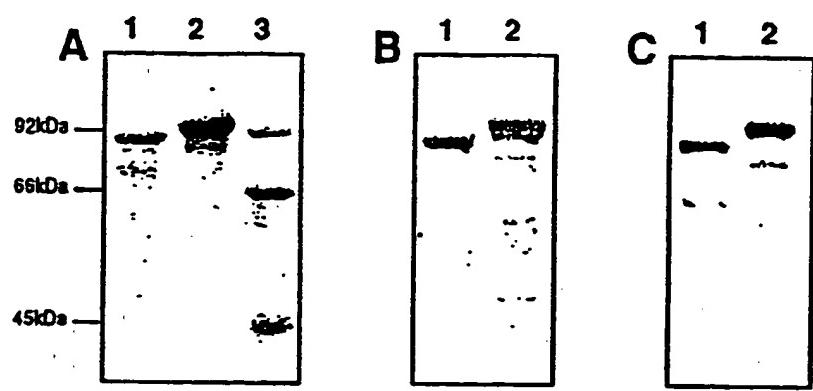


Figure 7

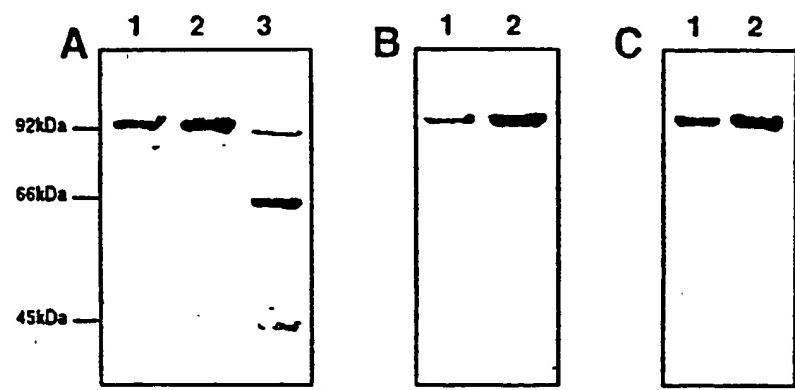


Figure 8

PRODUIT	IC ₅₀ (nM)
RG12986	50
③ SAH-vWF ₆₉₄₋₇₀₈	50000
③ SAH-vWF _{C471,474->G} ⁴⁷⁰⁻⁷¹³	20
③ SAH-vWF _{C471,474->G} ⁴⁷⁰⁻⁷⁰⁴	<10

Key: 1 Product
 2 IC₅₀ (nM)
 3 HSA

Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. cl. 5 : C12N 15/12; C12N 15/62; C12N 15/14; C12N 5/10 A61K 37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 : C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0 255 206 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 3 February 1988, cited in the application see the whole document ---	1-23
Y	WO, A, 9 113 093 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORPORATION) 5 September 1991, see the whole document ---	1-23
Y	EP, A, 0 413 62 (RHONO-POULENC SANTE) 20 February 1991, cited in the application see the whole document ---	1-23
P,Y	WO, A, 9 300 357 (RHONE POULENC RORER INT HOLDING) 7 January 1993, see the whole document ---	1-23
P,Y	WO, A, 9 217 192 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 15 October 1992, see the whole document ---	1-23
P,Y	WO, A, 9 206 999 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 30 April 1992, see the whole document ---	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 June 1993 (16.06.93)

Date of mailing of the international search report
2 July 1993 (02.07.93)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Authorized officer

Faximile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00087

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY . (MICROFILMS) Vol. 263, NO.34, 5 December 1988, BALTIMORE, MD US pages 17901-17904 MOHRI, H. ET AL. 'Structure of the von Willebrand Factor domain interacting with glycoprotein Ib' cited in the application see the whole document ---	1-23
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. Vol. 164, No.3, 15 November 1989, DULUTH, MINNESOTA US pages 1339-1347 PIETU, G. ET AL. 'Production in Escherichia coli of a biologically active subfragment of von Willebrand Factor corresponding to the platelet glycoprotein Ib, collagen and heparin binding domains' see the whole document -----	1-23

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300087
SA 70241

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

16/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0255206	03-02-88	AU-B-	617981	12-12-91
		AU-A-	7371587	03-12-87
		JP-A-	63152396	24-06-88
WO-A-9113093	05-09-91	AU-A-	7496491	18-09-91
		EP-A-	0517826	16-12-92
EP-A-0413622	20-02-91	FR-A-	2650598	08-02-91
		CA-A-	2022539	04-02-91
		JP-A-	3178998	02-08-91
WO-A-9300357	07-01-93	AU-A-	2297792	25-01-93
WO-A-9217192	15-10-92	AU-A-	1757592	02-11-92
		AU-A-	9069591	20-05-92
		WO-A-	9206999	30-04-92
WO-A-9206999	30-04-92	AU-A-	9069591	20-05-92
		AU-A-	1757592	02-11-92
		WO-A-	9217192	15-10-92